



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

**EFEITO TRANSGERACIONAL DA OBESIDADE MATERNA POR
SUPERALIMENTAÇÃO PRECOCE SOBRE OS PARÂMETROS
BIOMÉTRICOS DA PROLE NA VIDA ADULTA**

LUCAS ARAÚJO FERREIRA

GOIÂNIA-GO

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), 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.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Lucas Araújo Ferreira

3. Título do trabalho

Efeito transgeracional da obesidade materna por superalimentação precoce sobre os parâmetros biométricos da prole na vida adulta

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado 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.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Mello Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 05/12/2022, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lucas Araújo Ferreira, Discente**, em 06/12/2022, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3380842** e o código CRC **4A479B60**.

LUCAS ARAÚJO FERREIRA

**EFEITO TRANSGERACIONAL DA OBESIDADE MATERNA POR
SUPERALIMENTAÇÃO PRECOZE SOBRE OS PARÂMETROS
BIOMÉTRICOS DA PROLE NA VIDA ADULTA**

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

GOIÂNIA-GO

2022

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

Ferreira, Lucas Araújo
EFEITO TRANSGERACIONAL DA OBESIDADE MATERNA POR
SUPERALIMENTAÇÃO PRECOCE SOBRE OS PARÂMETROS
BIOMÉTRICOS DA PROLE NA VIDA ADULTA [manuscrito] / Lucas
Araújo Ferreira. - 2022.
XI, 48 f.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2022.

Bibliografia.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de
figuras, lista de tabelas.

1. Programação Metabólica. 2. Obesidade. 3. DOHaD. 4.
Metabolismo. 5. Insulina. I. Gomes, Rodrigo Mello, orient. II. Título.

CDU 57



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 547 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Lucas Araújo Ferreira** o título de Mestre em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e nove dias do mês de agosto de 2022, a partir das 14:00 horas, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Efeito transgeracional da obesidade materna por superalimentação precoce sobre os parâmetros biométricos da prole na vida adulta”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora Rosiane Aparecida Miranda (UERJ), membro titular externo; Professora Doutora Renata Mazaro e Costa (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não** sugeriu de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido o candidato **aprovado** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Rodrigo Mello Gomes, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e nove dias do mês de agosto de 2022.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Mello Gomes, Professor do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 09:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Mazaro Costa, Professora do Magistério Superior**, em 30/08/2022, às 12:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rosiane Aparecida Miranda, Usuário Externo**, em 30/08/2022, às 13:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3142297** e o código CRC **6B2DD85C**.

Referência: Processo nº 23070.043163/2022-72

SEI nº 3142297

Dedicatória

Dedico esta dissertação a mim, Lucas Araújo Ferreira por ter se esforçado bastante e ter tido uma das maiores reviravoltas de sua vida durante a pós-graduação. Por isso, quero que o Lucas do futuro quando reler este documento, possa sempre lembrar que a vida é uma caixinha de surpresas, e o que me admira em você é a sua habilidade de filtrar e agregar a sua vida apenas as coisas boas de cada experiência.

Dedico também aos meus pais, Elias Batista Ferreira e Maria Valdilene Araújo da Silva, por todo o apoio que me deram durante a minha formação acadêmica, por acreditarem em mim e no meu futuro, independente do caminho que eu decida, sempre me apoiaram.

Agradecimentos

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade. Eu aprendi, vivi, cresci muito, além de ter desmistificado e ressignificado vários ideais e valores de vida. Conheci pessoas maravilhosas que já levo e levarei para toda a minha vida. É indiscutível que sem essa jornada, eu não teria evoluído e aprendido a ressignificar e me reinventar.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes, por ter me dado a oportunidade e proporcionado essa experiência incomparável.

Agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESP pelo financiamento que forneceram a mim, ao meu laboratório e à pesquisa científica nacional. Torço muito para que o cenário de cortes mude e que as pessoas deem mais valor à ciência.

Agradeço fortemente aos meus colegas de laboratório, em especial aos alunos e ex-alunos do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Metabolismo (LabFEM): Alba Valéria, Beatriz Gonçalves, Dhiógenes Campos, Larissa Ribeiro, Orion Ribeiro, Raquel Cardoso e Yasmin Teixeira. O apoio e o acolhimento que vocês me deram foi fundamental e, crescer juntamente com cada um foi incrível. Torço muito pelo sucesso de cada um. É muito bom trabalhar num ambiente em que você se sente bem, inclusive por isso me sinto bastante sortudo e sou extremamente grato por cada sorriso que me proporcionaram mesmo quando tudo parecia estar perdido.

Agradeço muito aos meus amigos da Universidade, que mesmo não contribuindo diretamente com o desenvolvimento deste trabalho, a companhia foi primordial, agradável, acolhedora e inspiradora: Amanda Nunes, Andréa Moreira, Hericles Mesquita, Kareem Lays, Ludyanne Carla, Renato Rodrigues e Stephane Cardoso. Vocês me proporcionaram momentos tão incríveis e espetaculares, por isso torço muito mesmo para que o mundo retorne a graça e o carinho que sempre me deram. Vocês são um dos motivos pelos quais não me arrependo de ter feito este mestrado, pois se não, não os teria conhecido.

Agradeço aos meus colegas e os professores do Centro de Pesquisa em Neurociências e Fisiologia Cardiovascular (CPNFC) pelos momentos de aprendizado. Sem dúvidas, foram situações e lições que levarei para o resto da vida, me rendeu vários aprendizados e muitas boas risadas.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	VI
Lista de Figuras.....	VII
Lista de Tabelas.....	VIII
Resumo.....	IX
Abstract	X
Impacto e relevância da pesquisa para a sociedade	XI
1 Introdução.....	1
2 Objetivos.....	7
3 Metodologia.....	8
4 Resultados	13
5 Discussão.....	20
6 Conclusões.....	24
8 Referências Bibliográficas.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT – Proteína Kinase B

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DOHaD - *Developmental Origins of Health and Disease* / Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença

DCiF – Departamento de Ciências Fisiológicas

DHC – Dieta hipercalórica

DNA – ácido desoxirribonucleico

EPM – Erro Padrão da Média

F1 – Primeira geração

F2 – Segunda geração

HE – Hematoxilina-Eosina

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

IMC – Índice de massa corporal

IR- β – Subunidade beta do receptor de insulina

IRS – Substrato para o receptor de insulina

M – Média

MCP-1 – Proteína quimiotática de monócito

Mi-RNAs – Micro-RNAs

NL – *Normal litter*

NLO – *Normal litter offspring*

NPY – Neuropeptídeo Y

PI3K – fosfoinositidil-3-fosfato

PN – *Post natal day*

POMC – Pró-opiomelanocortina

RNA – Ácido ribonucleico

SL – *Small litter*

SLO – *Small litter offspring*

TBST – *Tris Buffer Solution-Tween*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

UFG – Universidade Federal de Goiás

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Efeitos dos insultos perinatais na programação de fisiopatologias na prole. Fonte: *Developmental Programming, a Pathway to Disease*.....4
- Figura 2.** Principais mecanismos da epigenética. Fonte: Adaptado de *Epigenetic mechanisms underlying cardiac degeneration and regeneration*.....5
- Figura 3.** Delineamento experimental. Primeira geração (F1); segunda geração (F2); dia pós-natal (PN).....9
- Figura 4.** Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a evolução da massa corporal dos filhotes (F2) machos e fêmeas durante o período experimental.....14
- Figura 5.** Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a ingestão alimentar dos filhotes (F2) machos e fêmeas durante o período experimental.....15
- Figura 6.** Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a concentração plasmática de glicose e triglicérides dos filhotes (F2) machos e fêmeas durante o período experimental.....16
- Figura 7.** Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre morfologia do tecido adiposo branco e marrom de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida.....17
- Figura 8.** Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a massa do pâncreas e o remodelamento da ilhota pancreática de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida.....18
- Figura 9.** Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a expressão de sinalizadores da via da insulina no hipotálamo de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida.....19
- Figura 10.** Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a expressão de sinalizadores da via da insulina no hipotálamo de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida.....20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de anticorpos com fabricantes, fonte e fator de diluição.....	12
--	----

RESUMO

Entre as doenças não comunicáveis mais predominantes na atualidade, a obesidade destaca níveis crescentes a cada ano. Dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) apontam que cerca de 650 milhões de adultos são obesos, ou seja, muitos destes indivíduos estão em idade reprodutiva. A partir dessas informações, o presente estudo tem como objetivo avaliar os efeitos da obesidade induzida pelo modelo de superalimentação pós-natal materna, sobre parâmetros metabólicos na prole de ratos Wistar na idade adulta. Para isso, ratas Wistar não obesas com 70 dias de idade foram colocadas para cruzar com ratos também não obesos, constituindo a geração F0. Três dias após a concepção da primeira geração (F1), foi realizada a redução de ninhada na proporção de 3 animais fêmeas por ninhada constituindo o grupo ninhada reduzida (Small Litter, SL) e 9 animais fêmeas por ninhada para os grupos controle (Normal Litter, NL). Aos 70 dias de idade, as ratas F1 foram submetidas ao cruzamento com ratos não obesos e após a concepção da segunda geração (F2), as ninhadas foram padronizadas para 6 filhotes por mãe (3 filhotes machos e 3 fêmeas). Após o desmame, a geração F2 foi separada nos seguintes grupos experimentais: filhotes machos e fêmeas de mães NL: M-NLO e F-NLO; e filhotes de mães SL: M-SLO e F-SLO. Os filhotes foram acompanhados até os 120 dias de idade. Ambas as proles M-SLO e F-SLO tiveram maior ingestão alimentar e ganho de massa corporal ao longo do período experimental, apresentaram fenótipo obeso, aumento da massa do pâncreas e da área das ilhotas pancreáticas. Contudo, as análises bioquímicas revelaram que apenas a prole M-SLO teve aumento nas concentrações plasmáticas de glicose e triglicérides. As análises moleculares demonstraram também que apenas a prole M-SLO teve redução na expressão da PI3K e da razão p-AKT/AKT no hipotálamo. Em conjunto, nossos dados evidenciam que a superalimentação materna pós-natal induz um fenótipo obeso tanto nos filhotes machos e fêmeas durante a vida adulta, assim como o remodelamento das ilhotas pancreáticas. Contudo, apenas nos filhotes machos foi observado desregulação de parâmetros bioquímicos e da via da insulina no hipotálamo, evidenciando um mecanismo sexo-específico.

Palavras-Chave: Programação metabólica; obesidade; DOHaD; metabolismo; insulina; hipotálamo

ABSTRACT

Among the most prevalent non-communicable diseases today, obesity stands out at increasing levels each year. More recent data from the World Health Organization (WHO) indicate that about 650 million adults are obese, that is, many of these individuals are of reproductive age. Based on this information, the present study aims to evaluate the effects of obesity induced by the maternal postnatal overfeeding model on metabolic parameters in the offspring of Wistar rats in adulthood. For this, non-obese Wistar rats with 70 days of age were placed to cross with non-obese rats, constituting the F0 generation. Three days after conception of the first generation (F1), litter reduction was carried out in the proportion of 3 female animals per litter constituted by the reduced litter group (Small Litter, SL) and 9 female animals per litter for the control groups (Normal Litter, NL). At 70 days of age, F1 rats were crossed with non-obese rats and after conception of the second generation (F2), litters were standardized to 6 pups per mother (3 male pups and 3 female pups). After weaning, the F2 generation was separated into the following experimental groups: male and female offspring from NL mothers: M-NLO and F-NLO; and pups from SL mothers: M-SLO and F-SLO. The pups were followed up to 120 days of age, when euthanasia and sample collection were performed. Both M-SLO and F-SLO offspring had higher food intake and body mass gain throughout the experimental period, presented obese phenotype, increased pancreas mass and pancreatic islet area. However, biochemical analyzes revealed that only the M-SLO offspring had an increase in plasma concentrations of glucose and triglycerides. Molecular analyzes also showed that only the M-SLO offspring had a reduction in the expression of PI3K and p-AKT/AKT ratio in the hypothalamus. Taken together, our data evidence that postnatal maternal overfeeding induces an obese phenotype in both male and female offspring during adulthood, as well as pancreatic islet remodeling. However, only in male offspring dysregulation of biochemical parameters and of the insulin pathway in the hypothalamus was observed, evidencing a sex-specific mechanism.

Key words: Metabolic programming; obesity; DOHaD; metabolism; insulin; hypothalamus

IMPACTO E RELEVÂNCIA DA PESQUISA PARA SOCIEDADE

Este estudo mostrou que a obesidade materna pode atuar como fator de risco para o desenvolvimento de diversas outras doenças na geração seguinte, ou seja, a saúde da mãe é de extrema importância e pode influenciar na saúde dos filhos que um dia ela poderá ter.

Em nossos achados, vimos que tanto os filhotes machos quanto fêmeas de ratas obesas, apresentaram aumento da fome e, conseqüentemente, aumento do peso e da gordura corporal, se tornando também obesos na vida adulta. Além disso, os filhotes machos e fêmeas apresentaram alterações no pâncreas, um órgão muito importante para o controle da glicemia, que é a quantidade de açúcar no sangue.

Também observamos que a glicemia, estava aumentada apenas nos filhotes machos, assim como os níveis de triglicérides, que é um tipo gordura no sangue. Em contrapartida, as fêmeas apresentaram ambos parâmetros normais, o que nos faz questionar o motivo desses efeitos maléficos aparecerem apenas nos filhotes machos.

Nós também vimos que uma importante região do cérebro chamada hipotálamo, que é responsável pelo controle da saciedade, ou seja, vontade de comer mais ou menos alimentos, estava com suas funções desreguladas também apenas nos filhotes machos, o que nos faz pensar sobre o que acontece no organismo dos machos e quais os próximos passos para completar esse quebra-cabeça.

Vale a pena lembrar que, embora este trabalho tenha sido realizado em um modelo experimental animal, os dados observados nos auxiliam a compreender as conseqüências do nosso estilo de vida, sendo um importante aliado na busca de estratégias de prevenção e/ou terapia de doenças crônicas, como a obesidade, evitando, dessa forma, que atinjam as futuras gerações.

1. INTRODUÇÃO

O avanço da sociedade para o século XXI foi marcado pela queda do número de mortes e enfermidades causadas pelas doenças comunicáveis, cuja forma de transmissão ocorre de uma pessoa para outra por meio de diversas maneiras como o contato com sangue, pelo ar ou através de vetores ambientais. Por outro lado, o número de mortes causadas pelas doenças não comunicáveis, resultantes da combinação de fatores genéticos, fisiológicos, ambientais e comportamentais, cresceu significativamente. Entre as doenças não comunicáveis mais predominantes na atualidade, a obesidade atinge níveis crescentes a cada ano, de modo que dados da Organização Mundial de Saúde no ano 2016 apontam que há cerca de 650 milhões de adultos e 124 milhões de crianças com obesidade, sendo que o número de adultos com obesidade triplicou nos últimos 40 anos (1). No Brasil, essa doença teve um aumento de 72% nos últimos treze anos, partindo de 11,8% em 2006 para aproximadamente 20% em 2019. Considerando o índice de massa corporal (IMC) como principal fator indicador de sobrepeso e obesidade, em relação aos adultos, há mais homens (57,1%) com sobrepeso (IMC maior que 25) do que mulheres (53,9%), todavia os valores de obesidade (IMC maior que 30) são maiores entre mulheres (20,7%) do que entre homens (18,7%). Além disso, 12,9% das crianças brasileiras entre 5 e 9 anos de idade têm obesidade, assim como 7% dos adolescentes na faixa etária de 12 a 17 anos (2).

Paralelamente, o crescimento da indústria voltada a produção e comercialização de alimentos processados e ultraprocessados, assim como mudanças no estilo de vida que englobam desde o acesso, a escolha e construção dos hábitos alimentares, assim como alterações nas rotinas e estilo de vida, resultaram em uma tendência que leva a população ser mais sedentária e a consumir dietas hipercalóricas (DHC) (3). Portanto, a combinação entre esses dois fatores leva a um balanço energético positivo, de modo que o consumo maior de calorias do que o necessário para a manutenção das reações fisiológicas e realização de atividades individuais, resulta num excedente calórico que é armazenado em forma de triacilgliceróis pelo tecido adiposo e que, conseqüentemente, aumenta a massa corporal do indivíduo (4,5).

O tecido adiposo, recentemente tem sido referido como órgão endócrino na literatura científica devido ao crescente número de pesquisadores evidenciando a

sua complexidade, multifunções e integralidade com outros órgãos e sistemas fisiológicos. As células que constituem o tecido adiposo, os adipócitos, sintetizam citocinas pró-inflamatórias como as interleucinas 6 (IL-6) e 8 (IL-8), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimiocinas para células do sistema imune, como a proteína quimiotática de monócito (MCP-1) (6). Dessa maneira, a hipertrofia dos adipócitos, também observada na obesidade, exacerba o processo de síntese dessas citocinas e quimiocinas, resultando em uma inflamação sistêmica no indivíduo. Com isso, a obesidade se torna um fator contribuinte no desenvolvimento de distúrbios metabólicos e outras doenças como a resistência à insulina, diabetes do tipo 2, dislipidemia, hipertensão, cardiomiopatia, infertilidade, esteatose hepática não alcoólica, distúrbios emocionais e aumento do risco de desenvolvimento de câncer (7–9).

Além disso, a hipertrofia dos adipócitos também aumenta a síntese do hormônio leptina, responsável principalmente pela sensação de saciedade, o que contribui para um quadro de resistência a ação da leptina (10). A perda da responsividade a leptina, ocasionalmente leva a perda da sua capacidade de regular negativamente a secreção da insulina no período pós-prandial, que promove a resistência à insulina. Um dos efeitos fisiológicos comuns tendo em vista a resistência à insulina e a leptina, é o aumento do acúmulo de triacilgliceróis nos adipócitos que, com o passar do tempo, perdem a capacidade estocar totalmente esses lipídios, assim ocorrendo então a deposição ectópica dos mesmos, atingindo principalmente órgãos como o fígado, o pâncreas e o coração (11).

Nos últimos 30 anos, a prevalência da obesidade tem crescido significativamente em homens e mulheres adultos, principalmente aqueles residentes em países desenvolvidos. Contudo, este aumento da prevalência ocorreu principalmente durante a idade reprodutiva (12), um achado preocupante, pois na literatura científica há diversos estudos que relacionam a ocorrência de insultos, como a obesidade materna e/ou paterna, ao maior risco de desenvolvimento de doenças na prole ao nascimento, na infância, na adolescência e na vida adulta (13–15). Ademais, dados referentes a estudos clínicos indicam que a obesidade é uma das doenças que quando acometem a saúde das mães tem repercussões em sua prole (16). Para a mãe, a obesidade durante a gestação aumenta as chances de diabetes gestacional e pré-eclâmpsia (17,18), enquanto para o filho há maior risco

de abortos, além da maior susceptibilidade em desenvolver síndrome metabólica e doenças cardiovasculares como a hipertensão, na vida adulta (19,20).

Essa relação entre o bem-estar dos pais e a saúde da prole, em períodos sensíveis do desenvolvimento são chamados de “janelas de programação”, pois é bastante evidenciado pela literatura científica de que insultos que venham a ocorrer durante estas fases podem comprometer o desenvolvimento de órgãos e/ou sistemas da prole (21,22). Esta relação também é chamada de plasticidade fenotípica e teve sua origem com o estudo de 1986 publicado por David Barker e Charles Osmond, no qual evidenciaram, por meio de dados epidemiológicos, que na Inglaterra e País de Gales havia uma relação entre o estado nutricional, a mortalidade infantil e a prevalência de isquemia cardíaca (23) e, posteriormente, também correlacionou o baixo peso ao nascer com o desenvolvimento de hipertensão e outras doenças cardíacas na vida adulta (24).

Os estudos que correlacionaram aspectos nutricionais dos indivíduos em fases iniciais do desenvolvimento com o surgimento de fisiopatologias ao decorrer da vida, culminaram na publicação da “Hipótese do Fenótipo Pougador”, que propõe a importância de um aspecto nutricional de qualidade durante o período gestacional e nos anos iniciais de vida, assim garantindo o desenvolvimento saudável dos órgãos e sistemas. Assim, um ambiente de pior disponibilidade de nutrientes nessa fase levaria a adaptações fisiológicas que aumentaria as chances de sobrevivência neste ambiente de escassez de nutrientes. Todavia, um ambiente de normalidade ou sobrecarga de nutrientes, as adaptações fisiológicas originariam patologias, como por exemplo, a obesidade e o diabetes do tipo 2 (25,26).

Décadas após a publicação dos primeiros trabalhos de Barker, sua hipótese foi cada vez mais expandida e mais estudos na literatura prosseguiram elucidando a importância das janelas de programação para a saúde do indivíduo, inclusive evidenciando que a plasticidade fenotípica pode iniciar desde a formação do oócito até fases mais tardias do desenvolvimento, como a puberdade (Fig. 1). A partir da ideia de que não só a probabilidade de ocorrência de doenças, assim como o estado de saúde do indivíduo estavam correlacionadas, surgiu-se o termo DOHaD, que traduzido para o português significa “Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença” e hoje se consolida como uma área da ciência, possuindo diversos pesquisadores colaboradores ao redor do mundo (27).

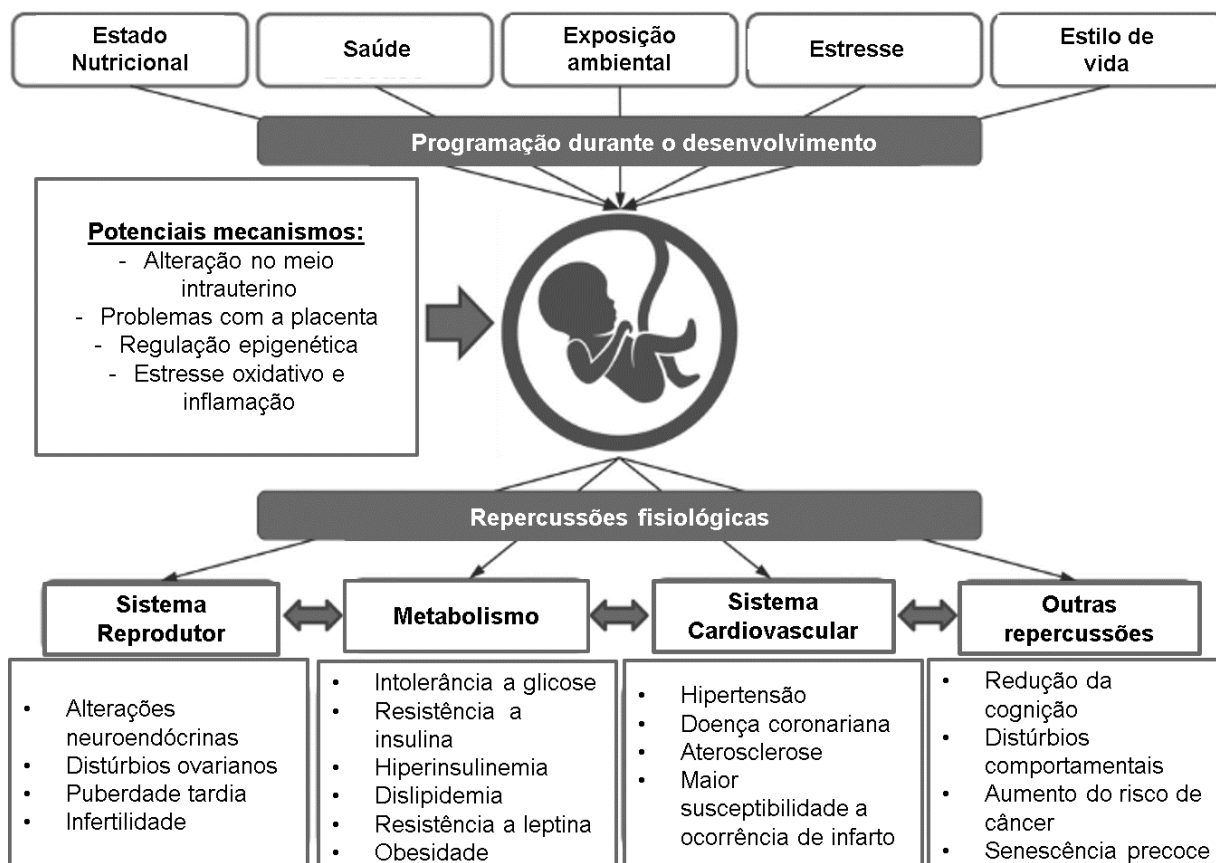


Figura 1. Efeitos dos insultos perinatais na programação de fisiopatologias na prole. Fonte: Adaptado de Developmental Programming, a Pathway to Disease (Padmanabhan et. al, 2016).

A epigenética é uma área da ciência que estuda alterações no fenótipo que sem que haja mudanças na sequência de DNA e que perpetuam nas divisões celulares, tanto as meióticas quanto as mitóticas. Dessa forma, durante o desenvolvimento de um organismo, o DNA contido nas células acumula possíveis modificações estruturais que influenciam na expressão de genes e, a literatura científica aponta que o estilo de vida, a alimentação, o exercício físico e a exposição a fatores ambientais são potenciais fatores que promovem o acúmulo dessas modificações (28).

Dessa forma, a epigenética possui papel fundamental nos mecanismos que promovem a plasticidade fenotípica. Insultos que ocorrem durante as janelas de programação são capazes de causar modificações herdáveis na fita do DNA de modo que irão resultar em regiões da fita mais ou menos condensadas, assim, alterando a expressão de genes e conseqüentemente terão interferência na expressão de seus produtos, ou seja, podem alterar a quantidade e/ou a

funcionalidade de proteínas, enzimas e RNAs (Fig. 2) (29,30). A acetilação, metilação e fosforilação de histonas, a metilação de regiões de nucleotídeos do DNA, a elevação das reações de ubiquitinação e dos sistemas de proteossomas, o aumento ou a diminuição da expressão de micro-RNAs, são os principais mecanismos pelos quais a epigenética pode atuar (31).

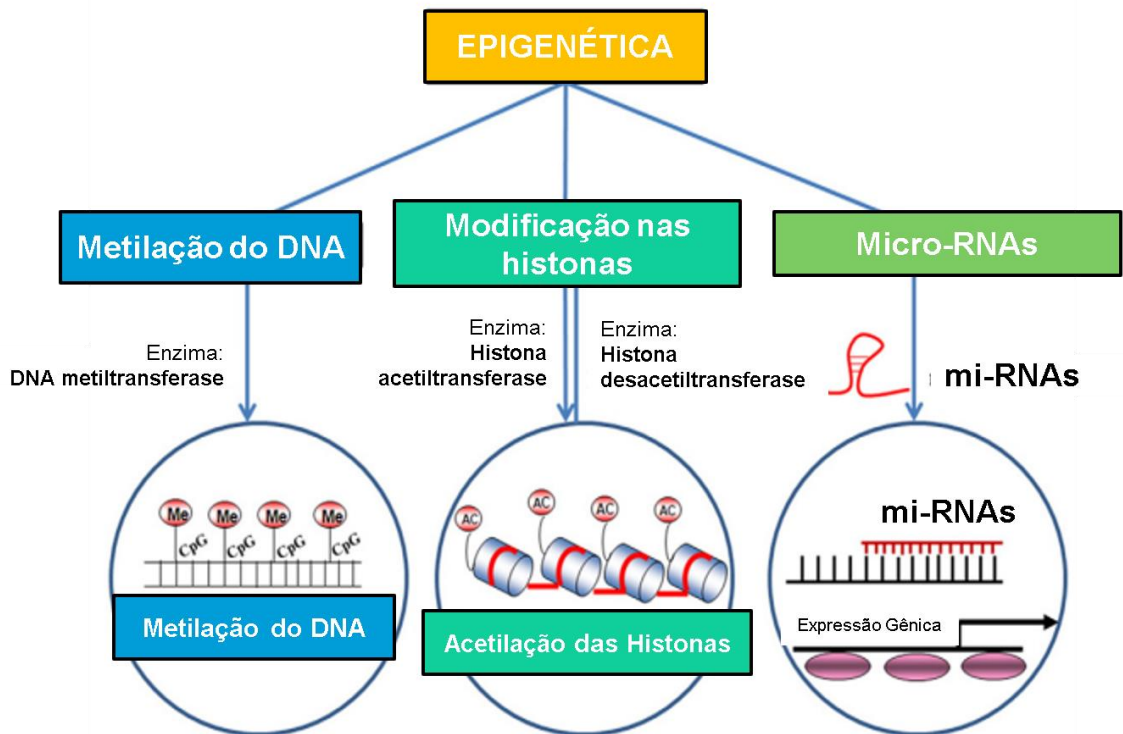


Figura 2. Principais mecanismos da epigenética. Fonte: Adaptado de Epigenetic mechanisms underlying cardiac degeneration and regeneration (Chaturvedi et. al 2014).

Além disso, fatores ambientais podem atuar como gatilhos, negativos ou positivos, para o desencadeamento de mecanismos epigenéticos, como a exposição a fumaça de cigarro (32), o contato com disruptores neuroendócrinos (33,34), o estresse (35), a prática de exercício físico (36) e o cuidado parental (37).

Estudos em modelos animais evidenciaram que a indução da obesidade materna pela ingestão de DHC durante a gestação está relacionada com o surgimento de diversas fisiopatologias em sua prole como síndrome metabólica, diabetes do tipo 2, obesidade, remodelamento cardíaco, hipertensão, disfunção vascular e disfunção cognitiva (38–40). Além disso, o modelo de indução de obesidade por superalimentação pós-natal por meio da redução de ninhada, mostra-

se um bom modelo para avaliar os impactos do sobrepeso e da obesidade infanto-juvenil e os efeitos na idade adulta. Resistência à insulina e à leptina, aumento da adiposidade corporal, aumento dos sinais orexigênicos no hipotálamo, alteração da expressão de genes, aumento do estresse oxidativo e da inflamação em órgãos como coração, rins, fígado e tecido adiposo são os principais efeitos vistos na idade adulta, causados pela superalimentação pós-natal (41–44). Ademais, o sexo dos conceptos ou neonatos pode atuar como um fator modulador para a programação fetal, de modo que as fisiopatologias consequentes do insulto sofrido pela mãe durante as janelas de programação podem ser amenizadas ou agravadas de acordo com o sexo da prole (45–49). Outros grupos de pesquisa mostraram que a obesidade materna por meio de DHC causa alterações sexo-específica de parâmetros metabólicos, como alterações a nível de sistema nervoso central como disfunção hipotalâmica e alterações a nível periférica do mecanismo de ação da leptina e insulina (45,50,51).

Embora haja na literatura diversas evidências que indicam uma relação entre a obesidade materna e o desenvolvimento de fisiopatologias em sua prole durante a idade adulta, pouco se conhece sobre como o sexo da prole pode influenciar nos efeitos fisiopatológicos acarretados pelo ambiente obesogênico durante a gestação. Com isso, o presente estudo visa permitir uma melhor compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento dos efeitos fisiopatológicos sobre o metabolismo da prole de machos e fêmeas concebidas por ratas submetidas a superalimentação pós-natal, durante a vida adulta. Além disso, o presente estudo visa contribuir para o desenvolvimento de futuras intervenções que envolvam a prevenção, controle e práticas terapêuticas capazes de amenizar a problemática do crescente número de pessoas acometidas com essas fisiopatologias.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos da superalimentação pós-natal materna sobre parâmetros metabólicos em sua prole na idade adulta.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar na prole de ambos os sexos de ratas submetidas a superalimentação pós-natal:

- A ingestão alimentar, a evolução do peso corporal, a adiposidade visceral e subcutânea;
- As alterações morfológicas no pâncreas, tais como, aumento da área das ilhotas pancreáticas;
- A expressão proteica das proteínas/enzimas da via da insulina: IR, IRS-1, IRS-2, PI3K, AKT no hipotálamo, por meio de western blot.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MODELO ANIMAL E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi conduzido seguindo as normativas e regimentos norteados pelos 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, mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFG (CEUA/UFG) de nº 043/2017.

Ratos Wistar machos e fêmeas (geração F0) com 60-70 dias de idade (200 – 250 g) 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), UFG - Campus Samambaia, Goiânia, GO. Durante todo o período experimental os animais foram alocados em caixas de polipropileno (45 x 30 x 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 acesso de água e ração à vontade (Nuvilab, Colombo, Paraná, Brasil).

Após uma semana de adaptação, os animais foram submetidos ao cruzamento na proporção de duas fêmeas ($n = 22$) para um macho ($n = 11$). Constatada a prenhez pela presença de espermatozoides em lâminas de lavado vaginal, as fêmeas foram alocadas em caixas individuais de polipropileno (45 x 30 x 15 cm) sob as mesmas condições descritas anteriormente.

No terceiro dia após o nascimento da primeira geração (F1), 11 fêmeas tiveram suas ninhadas reduzidas a três filhotes fêmeas cada mãe, constituindo o grupo redução de ninhada (small litter – SL), as outras 11 ratas tiveram suas ninhadas padronizada para 9 filhotes fêmeas, constituindo assim o grupo controle (normal litter – NL). Os filhotes excedentes foram submetidos a eutanásia por decapitação. Após o desmame, aos 21 dias de vida da prole, as fêmeas da geração F0 foram anestesiadas com tiopental sódico (45 mg/kg, IP, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) e submetidas a eutanásia. As fêmeas oriundas das proles (F1) foram alocadas em caixas de polipropileno (3 ratas/caixa) e, aos 70 dias de idade foram submetidas ao acasalamento na proporção de duas fêmeas para cada

macho (todos os machos que foram utilizados foram não obesos, não foram usados ratos da mesma ninhada das fêmeas para evitar consanguinidade “efeito ninhada”).

Após o nascimento da segunda geração (F2), as proles foram padronizadas para seis filhotes (3 machos e 3 fêmeas) por ninhada. Os neonatos excedentes foram submetidos a eutanásia por decapitação. Depois do desmame da F2, suas mães (geração F1) foram anestesiadas com tiopental sódico (45 mg/kg, IP, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) para realização da eutanásia. As ninhadas foram divididas em caixas de polipropileno (3 animais do mesmo sexo/caixa), originando os seguintes grupos experimentais: filhotes machos e fêmeas vindos de mães controles (NLO – normal litter offspring) e filhotes machos e fêmeas vindo de mães obesas (SLO – small litter offspring) (Fig. 3). Após a separação dos grupos experimentais, a aferição da massa corporal e do consumo alimentar foi realizada semanalmente até o dia da eutanásia.

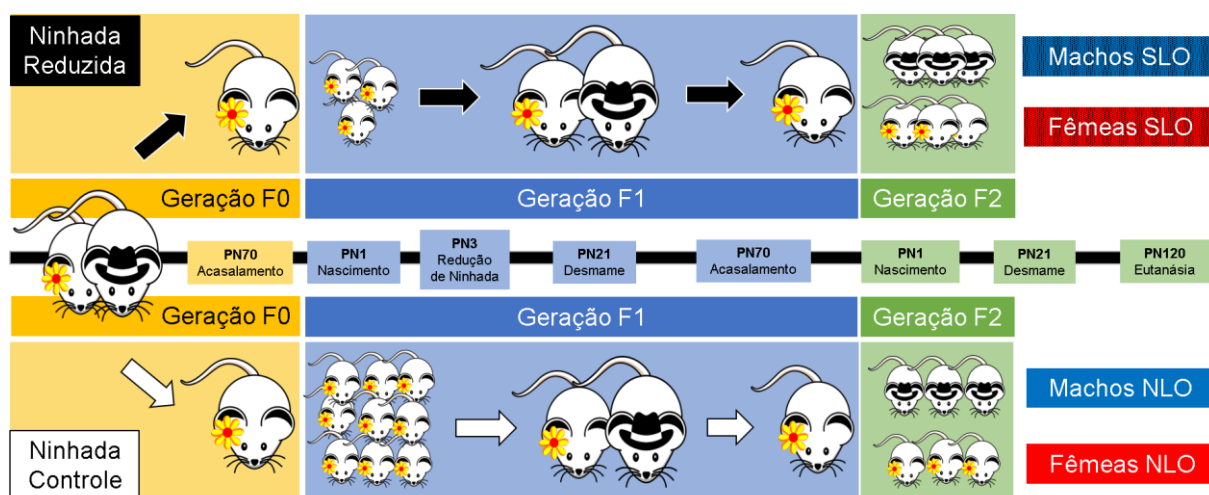


Figura 3. Delineamento experimental. Primeira geração (F1); segunda geração (F2); dia pós-natal (PN). Fonte: O autor.

3.2 EUTANÁSIA E COLETA DE ÓRGÃOS

A eutanásia dos animais (n = 10 animais de diferentes ninhadas por grupo) foi realizada aos 120 dias de vida. Submetidos a um jejum de 12 horas, os animais foram anestesiados previamente com tiopental sódico (45 mg/kg, IP, Thiopentax®, Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil) associado ao anestésico local Lidocaína (1 mg/kg de massa corporal, i.p; Cristália, São Paulo, Brasil) para realização da

eutanásia por exsanguinação, com coleta de sangue por punção venosa da veia cava com seringa previamente heparinizada (Hepamax, Blau Farmacêutica, Cotia, SP, Brasil). As amostras de sangue foram centrifugadas durante 15 minutos a 7000 rpm para separação do plasma. Logo após, o plasma foi coletado e armazenado em um freezer a -80 °C para posterior realização das dosagens bioquímicas.

Em seguida, o hipotálamo foi coletado e armazenado no freezer a -80°C para futuras análises moleculares. Paralelamente, o fígado, pâncreas, tecido adiposo branco (inguinal, retroperitoneal, perigonadal e mesentérico) e tecido adiposo marrom tiveram suas massas aferidas em uma balança analítica. Amostras de pâncreas foram fixadas em formol 10% para análises morfológicas. A tíbia direita foi medida após a retirada do platô tibial, por meio de um paquímetro de precisão.

3.2 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

Os níveis plasmáticos de glicose e triglicérides foram quantificados por espectrofotometria (Analisador Bioquímico Semiautomático, BIO 200FL, Bio Plus®, São Paulo, Brasil), por meio da utilização dos kits comerciais enzimático-colorimétricos (Bioclin – Quibasa Química Básica, Belo Horizonte, Brasil), seguindo as informações do fabricante, com os resultados expressos em mg/dl.

3.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

Amostras de pâncreas (n = 6 animais de diferentes ninhadas por grupo) foram fixadas em solução de formol a 10% e subsequentemente desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70-100%), diafanizadas em xilol, e incluídas em parafina histológica (Histopar, Easypath, São Paulo, Brasil). Em seguida, foram feitos cortes não seriados de 6 µm de espessura em um micrótomo (RM2245, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), com os cortes depositados sobre lâminas de vidro e secos em estufa a 37°C, para que, em seguida, fosse realizada a coloração por hematoxilina e eosina para avaliação morfológica dos tecidos.

Imagens digitalizadas (TIFF 24-bit color, 2560 × 1920 pixels) das lâminas de pâncreas montadas (n = 6 animais de diferentes ninhadas por grupo) foram obtidas no microscópio de luz (DM500, Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemanha) acoplado à uma câmera digital (ICC50 HD, Leica Microsystems®, Wetzlar, Alemanha). A partir

do aumento de 40x, obteve-se 35 imagens digitalizadas de ilhotas pancreáticas por lâmina. A aferição da área da ilhota foi realizada por meio do software ICY (Institut Pasteur & France-Biolmaging, Paris, França).

3.4 WESTERN BLOT

Amostras de hipotálamo (n = 6 animais de diferentes ninhadas por grupo) foram homogeneizadas em tampão (Triton-X- 100 1%, Tris 100 mM (pH 7,4), pirofosfato de sódio 100 mM, fluoreto de sódio 100 mM, EDTA 10 mM, ortovanadato de sódio 10 mM, PMSF 2 mM e aprotinina 0,01 mg/ml) com homogeneizador Polytron PTA 20S (Brinkmann Instruments) a 4° C. O extrato tecidual foi centrifugado a 12000 rpm a 4° C por 20 min para a remoção do material insolúvel. Após a centrifugação, foi quantificado o conteúdo proteico total através do método de Bradford com kit (BIO-RAD®, Hercules, CA, USA). Em seguida, as amostras foram desnaturadas em tampão TRIS-HCl (50 mM, pH 6,8, SDS 1%, 2-mercaptoetanol 5%, Glicerol 10%, azul de bromofenol 0,001%) e aquecidas a 95° C por 5 min. Alíquotas de 20 µg de proteínas de cada amostra foram submetidas à corrida por eletroforese em gel de poliacrilamida. Em cada gel havia um marcador de peso molecular com bandas de valores determinados (Precision Plus Protein Standards, BIO-RAD®, Hercules, CA, USA). As proteínas separadas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE®, Little Chalfont, Berckinghamshire, UK), através de um sistema de transferência Trans-Blot® TurboTM (BIO-RAD®, Hercules, CA, USA). Para bloquear sítios de ligações inespecíficas as membranas foram incubadas com uma solução bloqueadora (leite desnatado Molico® 5%, Tris 10 mM, NaCl 150 mM e Tween 20 0,02%) por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, as membranas foram incubadas com anticorpos primários específicos (Tabela 1). Essas incubações foram feitas com solução bloqueadora (0,3% de BSA) overnight a 4° C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBST 3X por 5 min e incubadas com o anticorpo secundário específico (Tabela 1) conjugado com peroxidase por 1 h e reveladas com solução para detecção por quimiluminescência (NOVEX® ECL, Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA). A quimiluminescência foi detectada e as imagens capturadas pelo sistema de imagens Chemi-Doc™ MP System (BIO-RAD®, Hercules, CA, USA). A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria óptica utilizando o software ImageJ 1.34s

(Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MS, USA). Todas as proteínas foram normalizadas tomando como referência a proteína GAPDH.

Tabela 1. Lista de anticorpos com fabricantes, fonte e fator de diluição.

Anticorpo	Fabricante e nº do catálogo	Fonte	Diluição
Anti-AKT	Cell Signaling, MA, EUA (9272S)	Rabbit polyclonal	1:500
Anti-pAKT	Santa Cruz, CA, EUA (SC-33437)	Rabbit polyclonal	1:200
Anti-IRβ	Santa Cruz, CA, EUA (SC-711)	Rabbit polyclonal	1:500
Anti-IRS-2	Santa Cruz, CA, EUA (SC-8299)	Rabbit polyclonal	1:500
Anti-PI3K	Cell Signaling, MA, USA (4292)	Rabbit polyclonal	1:500
Anti-GAPDH	Santa Cruz, CA, USA (SC-25778)	Rabbit polyclonal	1:500
Anti-Rabbit IgG- HRP	Santa Cruz, CA, USA (SC-2004)	Goat	1:1000
Anti-Mouse IgG- HRP	Santa Cruz, CA, USA (SC-2005)	Goat	1:1000

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm o erro padrão da média ($M \pm$ EPM). Para a comparação dos efeitos da superalimentação pós-natal na massa corporal e ingestão alimentar durante o período experimental, foi utilizada a Análise de Variância de duas vias, seguida do pós-teste de Sidak, com o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. Para as demais comparações foi utilizado o teste t-student com o nível de significância estabelecido em $p < 0,05$. Para as análises e representação gráfica foi utilizado o software GraphPad Prism® versão 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL MATERNA (F1) SOBRE A MASSA CORPORAL E INGESTÃO ALIMENTAR DA PROLE (F2)

A superalimentação pós-natal ocasionada por meio da redução de ninhada na F1 foi capaz de causar alterações no ganho de massa corporal e na ingestão alimentar na geração F2. Dessa forma, os filhotes machos e fêmeas pertencentes ao grupo SLO apresentaram maior massa corporal ($p < 0.05$ e $p < 0.005$ respectivamente) em relação ao grupo controle a partir do sétimo dia de vida (PN7), quadro que permaneceu até o vigésimo primeiro dia de vida (PN21) ($p < 0.0001$), ou seja, até o desmame (Fig. 4A e 4C). Embora no PN28 não houve diferença na massa corporal de ambos filhotes machos e fêmeas SLO, a partir da semana seguinte (PN35), quando comparados aos seus respectivos grupos NLO, os filhotes machos e fêmeas de mães obesas apresentaram maior massa corporal ($p < 0.05$ e $p < 0.005$ respectivamente) persistindo até o final do período experimental (PN120) ($p < 0.0001$) (Fig. 4B e D).

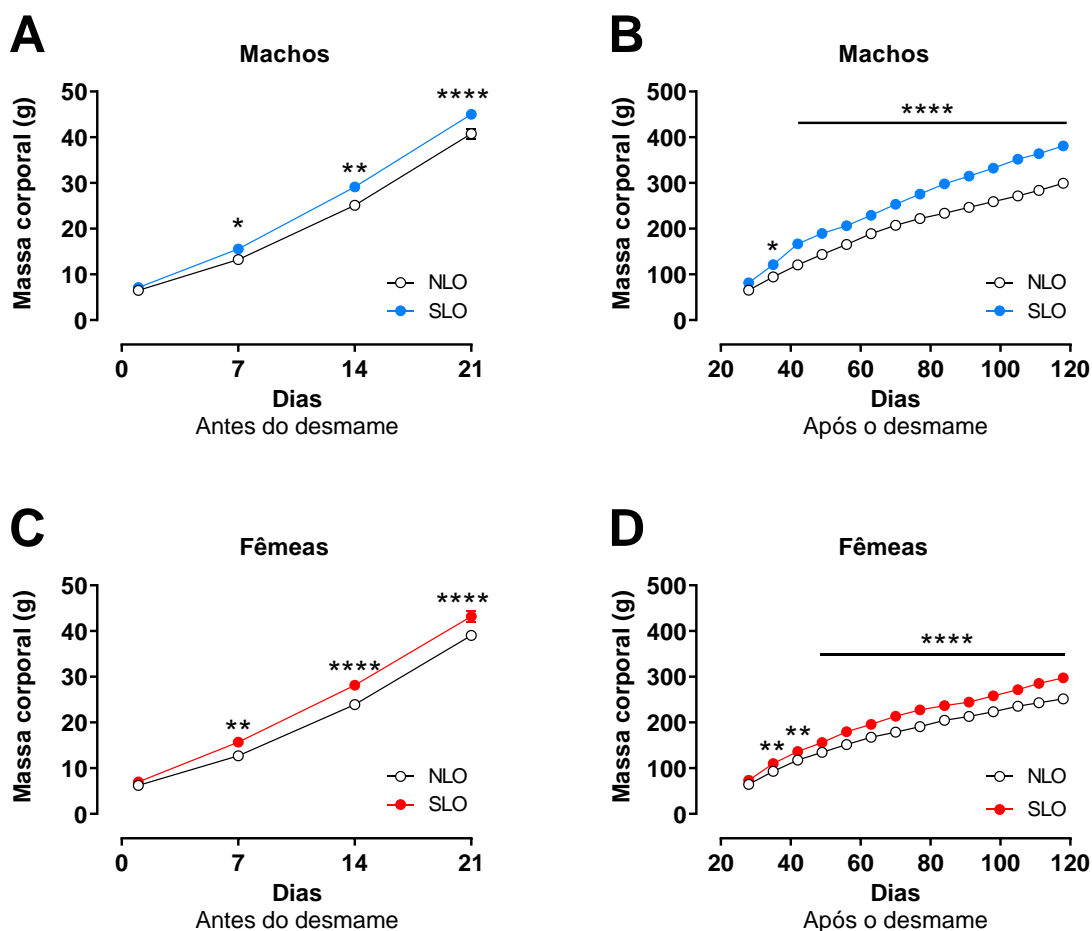


Figura 4. Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a evolução da massa corporal dos filhotes (F2) machos e fêmeas durante o período experimental. Curva da massa corporal, antes (A e C) e após o desmame (B e D) até os 120 dias de vida. Dados expressos em Média \pm EPM. Análise de Variância em duas vias foi utilizada, seguida do pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$ vs NLO.

Além disso, a partir dos 45 dias de vida, ambas proles F2 de machos e fêmeas do grupo SLO tiveram maior ingestão alimentar quando comparados aos seus respectivos grupos NLO, o que permaneceu até os 120 dias de vida (Fig. 5A e B), resultando em uma área sob a curva maior (machos NLO $237,5 \pm 2,750$ vs SLO $286,4 \pm 2,246$, $p = 0,0002$; fêmeas NLO $212,2 \pm 1,500$ vs SLO $254,3 \pm 3,604$, $p = 0,0031$) dos filhotes machos e fêmeas SLO quando aos filhotes machos e fêmeas NLO (Fig. 5C).

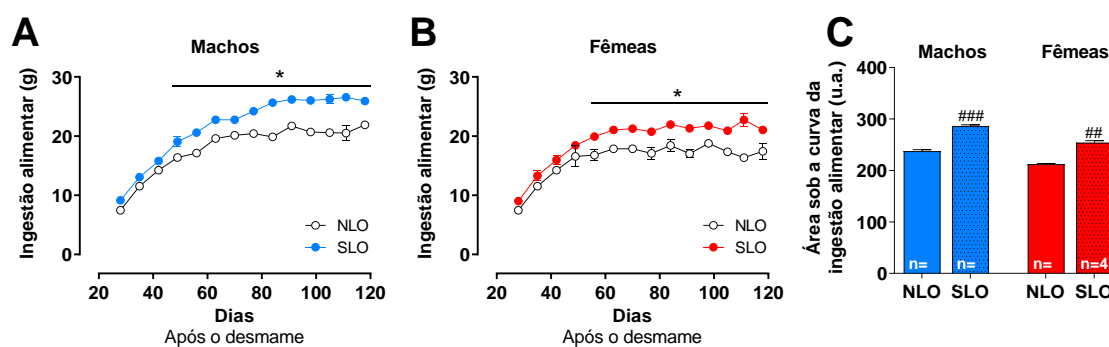


Figura 5. Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a ingestão alimentar dos filhotes (F2) machos e fêmeas durante o período experimental. Ingestão alimentar após o desmame da prole de machos (A), fêmeas (B) e sua respectiva área sob a curva (C). Dados expressos em Média \pm EPM. Análise de Variância em duas vias foi utilizada, seguida do pós-teste de Sidak. * $p < 0,05$ vs NLO. Teste t-student foi utilizado. ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ vs NLO.

4.2 EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL MATERNA (F1) SOB PARÂMETROS BIOQUÍMICOS DA PROLE (F2)

Na vida adulta, os filhotes machos do grupo SLO apresentaram alteração das concentrações plasmáticas de glicose (NLO $85,47 \pm 2,442$ mg/dL vs SLO $99,47 \pm 5,656$ mg/dl; $p = 0,0204$; Fig. 6 A) e triglicérides (NLO $39,94 \pm 6,221$ mg/dL vs SLO $47,48 \pm 7,896$ mg/dl; $p = 0,0320$; Fig. 6 B). No entanto, nos grupos experimentais das fêmeas, não houve diferença significativa na concentração plasmática de glicose (NLO $91,55 \pm 2,112$ mg/dL vs SLO $93,62 \pm 2,606$ mg/dl; $p = 0,5304$; Fig. 6 A) nem na de triglicérides (NLO $39,52 \pm 8,912$ mg/dL vs SLO $42,36 \pm 2,116$ mg/dl; $p = 0,5454$; Fig. 6 B).

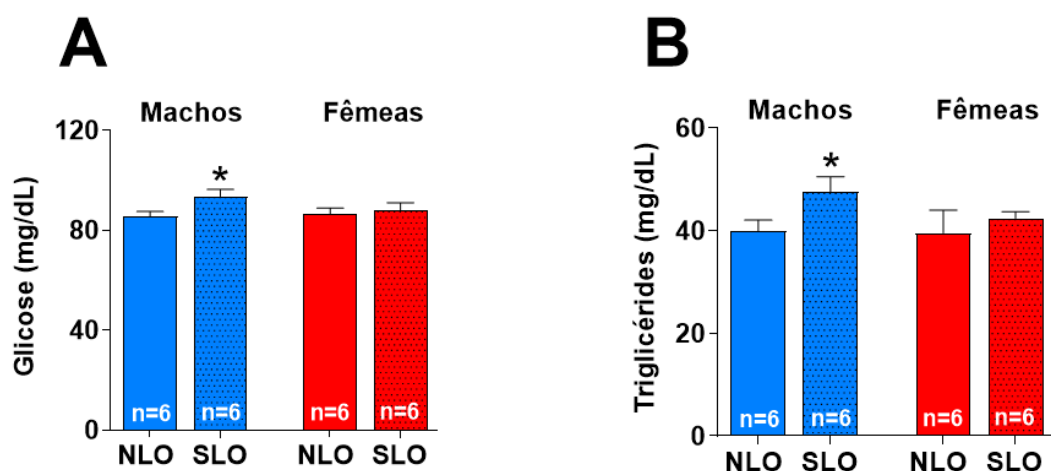


Figura 6. Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a concentração plasmática de glicose e triglicérides dos filhotes (F2) machos e fêmeas durante o período experimental. Concentração plasmática de (A) glicose e (B) triglicérides. Dados expressos em Média \pm EPM. Teste t-student foi utilizado. * $p < 0,05$ vs NLO.

4.3 EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL MATERNA (F1) SOB PARÂMETROS HISTOMORFOLÓGICOS DA PROLE (F2)

Aos 120 dias de vida, ambas as proles de machos e fêmeas SLO apresentaram um aumento do tecido adiposo branco retroperitoneal (machos NLO $0,4799 \pm 0,0501$ g/cm vs SLO $1,002 \pm 0,1486$ g/cm, $p = 0,0076$; fêmeas NLO $0,3565 \pm 0,0230$ g/cm vs SLO $0,5070 \pm 0,0371$ g/cm, $p = 0,0063$), mesentérico (machos NLO $0,2709 \pm 0,0271$ g/cm vs SLO $0,6774 \pm 0,0669$ g/cm, $p = 0,0002$; fêmeas NLO $0,3151 \pm 0,0202$ g/cm vs SLO $0,4576 \pm 0,0261$ g/cm, $p = 0,0015$) e gonadal (machos NLO $0,5052 \pm 0,0806$ g/cm vs SLO $0,9600 \pm 0,1152$ g/cm, $p = 0,0089$; fêmeas NLO $0,3049 \pm 0,0075$ g/cm vs SLO $0,7524 \pm 0,1680$ g/cm, $p = 0,0238$) (Fig. 7 A-C). No entanto, houve aumento do tecido adiposo branco inguinal apenas na F2 de machos, de modo que a prole de fêmeas não apresentou alteração neste parâmetro (machos NLO $0,2567 \pm 0,0114$ g/cm vs SLO $0,4851 \pm 0,0710$ g/cm, $p = 0,0100$; fêmeas NLO $0,2135 \pm 0,0239$ g/cm vs SLO $0,2245 \pm 0,0364$ g/cm, $p = 0,8054$) (Fig. 7 D). Além disso, a superalimentação pós-natal materna não alterou a massa do tecido adiposo marrom entre os grupos experimentais (machos NLO $0,0545 \pm$

0,0032 g/cm vs SLO $0,0559 \pm 0,0047$ g/cm, $p = 0,8180$; fêmeas NLO $0,0465 \pm 0,0033$ g/cm vs SLO $0,0569 \pm 0,0052$ g/cm, $p = 0,1224$) (Fig. 7 E).

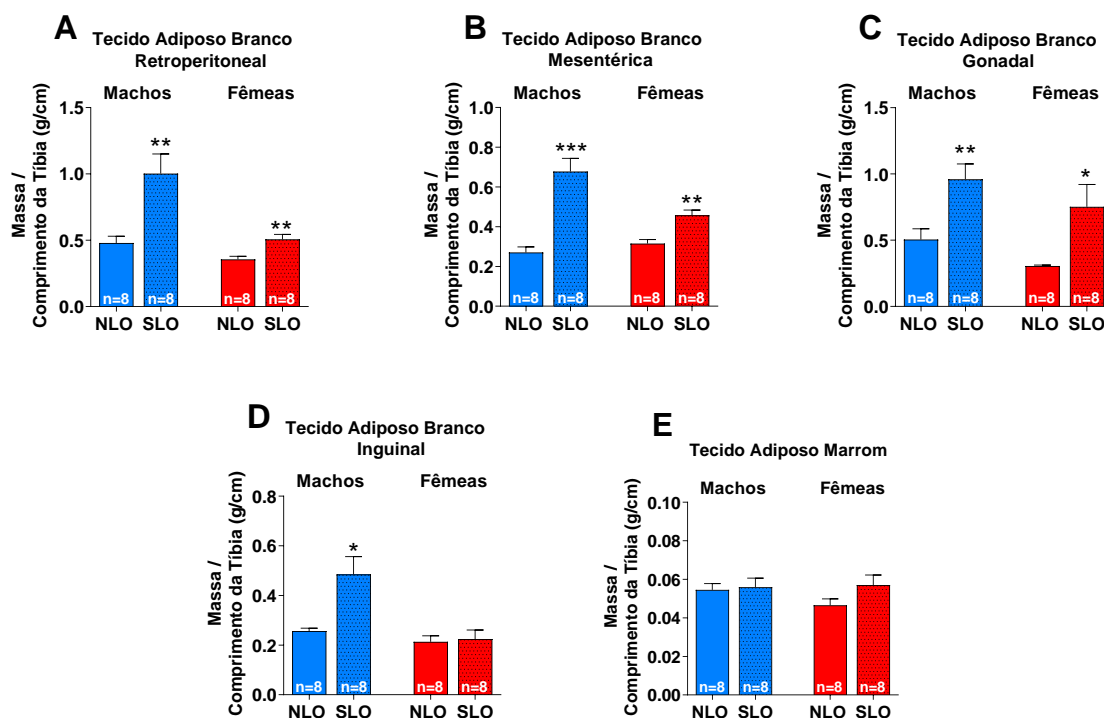


Figura 7. Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre morfologia do tecido adiposo branco e marrom de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida. Massa dos tecidos adiposos branco retroperitoneal (A), mesentérico (B), inguinal (C), gonadal (D) e do tecido adiposo marrom (E); os valores foram relativizados pelo comprimento da tíbia. Dados expressos em Média \pm EPM. Teste t-student foi utilizado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ vs NLO.

Além disso, a superalimentação pós-natal materna foi capaz de causar o aumento da massa do pâncreas (machos NLO $0,1998 \pm 0,0083$ g/cm vs SLO $0,2268 \pm 0,0072$ g/cm, $p = 0,0345$; fêmeas NLO $0,1592 \pm 0,0091$ g/cm vs SLO $0,1932 \pm 0,0096$ g/cm, $p = 0,0228$) de ambas proles de machos e fêmeas SLO quando comparados aos grupos NLO (Fig. 8 A). Ademais, as análises histológicas evidenciaram que o aumento na massa do pâncreas foi acompanhado pelo aumento da área da ilhota pancreática, de modo que ambos os grupos de filhotes de machos e fêmeas SLO tiveram o aumento da área da ilhota pancreática (machos NLO $18.549 \pm 951,3 \mu\text{m}^2$ vs SLO $27.864 \pm 2.007 \mu\text{m}^2$, $p = 0,0018$; fêmeas NLO $16.729 \pm$

997.9 μm^2 vs SLO $25.158 \pm 1.868 \mu\text{m}^2$, $p = 0,0018$) quando comparados aos seus respectivos grupos controles (Fig 8B e 8C).

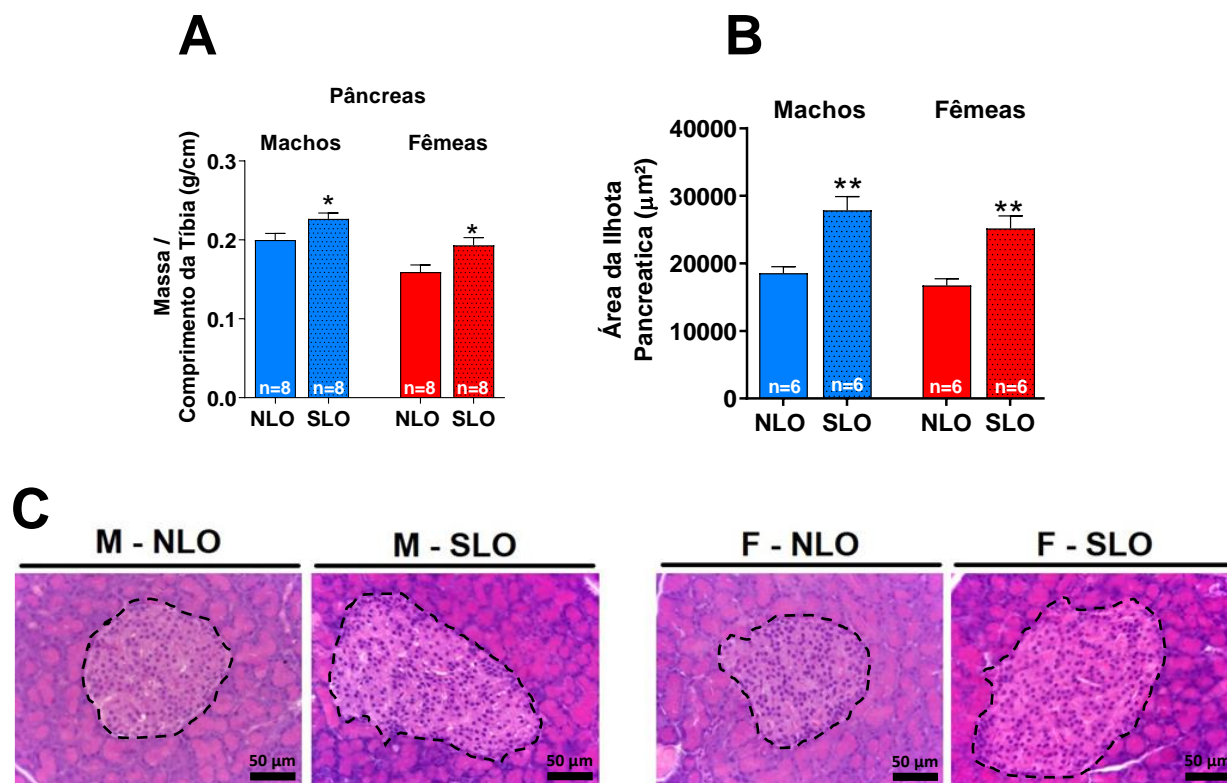


Figura 8. Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a massa do pâncreas e a área das ilhotas pancreáticas de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida. Massa do pâncreas (A) e avaliação histológica da área da ilhota pancreática, com as medidas da área da ilhota pancreática (B) e as fotomicrografias representativas aumento de 400x barra de escala representa 50 μm (C). Dados expressos em Média \pm EPM. Teste t-student foi utilizado. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ vs NLO.

4.3 EFEITOS DA SUPERALIMENTAÇÃO PÓS-NATAL MATERNA (F1) SOB A EXPRESSÃO PROTEICA DA VIA DA INSULINA NO HIPOTÁLAMO DA PROLE (F2)

As análises de western blot revelaram os efeitos da superalimentação pós-natal materna sobre a expressão de proteínas da via de sinalização da insulina no hipotálamo de sua prole. Ambos grupos de filhotes machos e fêmeas do grupo SLO não apresentaram alteração na expressão das proteínas IR- β (machos NLO $100,0 \pm$

11,21 % vs SLO 115,1 ± 18,06 %, $p = 0,2051$; fêmeas NLO 100,0 ± 11,42 % vs SLO 112,3 ± 36,60 %, $p = 0,5427$) e IRS-2 (machos NLO 100,0 ± 21,38 % vs SLO 114,1 ± 30,75 %, $p = 0,5028$; fêmeas NLO 100,0 ± 55,08 % vs SLO 112,3 ± 23,78 %, $p = 0,4883$) quando comparadas com seus respectivos grupos controle (Fig. 9 A e B). Todavia, a proteína PI3K teve sua expressão reduzida somente entre os grupos experimentais dos filhotes machos (machos NLO 100,0 ± 26,93 % vs SLO 55,30 ± 11,42 %, $p = 0,0223$; fêmeas NLO 100,0 ± 40,64 % vs SLO 90,56 ± 31,80 %, $p = 0,7244$) quando comparados aos seus respectivos controles, não havendo diferenças significativas nos grupos de fêmeas (Fig. 9 C).

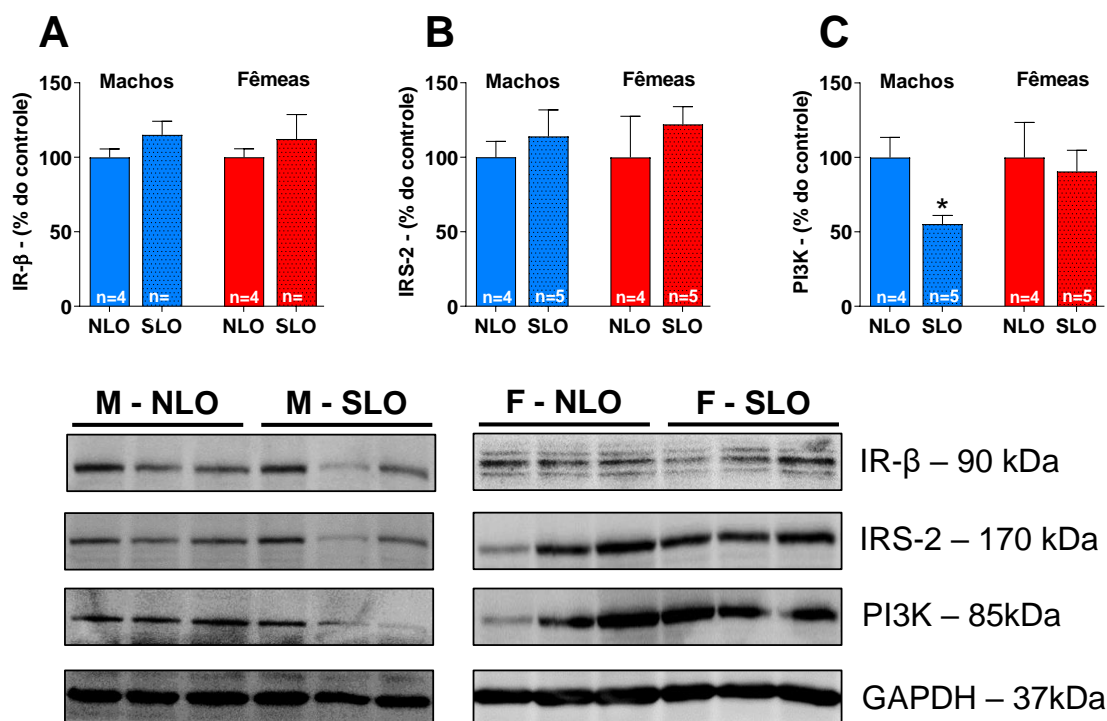


Figura 9. Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a expressão de sinalizadores da via da insulina no hipotálamo de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida. Expressão proteica do IR-β (A), IRS-2 (B) e PI3K (C) no hipotálamo. Imagens representativas dos *imunoblots* abaixo dos gráficos. Dados expressos em Média ± EPM. Teste t-student foi utilizado. * $p < 0,05$ vs NLO.

Além disso, as análises moleculares revelaram que a superalimentação pós-natal materna não foi capaz de alterar a expressão da AKT total (machos NLO 100,0 ± 16,25 % vs SLO 103,1 ± 8,438 %, $p = 0,7227$; fêmeas NLO 100,0 ± 17,38 % vs SLO 95,84 ± 5,894 %, $p = 0,6272$) nem da p-AKT (machos NLO 100,0 ± 11,83% vs

SLO $88,92 \pm 7,164$ %, $p = 0,1426$; fêmeas NLO $100,0 \pm 26,73$ % vs SLO $92,55 \pm 18,81$ %, $p = 0,6375$), em ambos os filhotes machos e fêmeas (Fig. 10 A e B). Contudo, houve uma diminuição da razão p-AKT/AKT (machos NLO $100,0 \pm 14,18$ % vs SLO $81,33 \pm 8,061$ %, $p = 0,0310$; fêmeas NLO $100,0 \pm 10,34$ % vs SLO $97,39 \pm 15,90$ %, $p = 0,7864$) somente nos filhotes machos quando comparados aos seus respectivos grupos controle, não havendo diferenças significativas entre os grupos experimentais das fêmeas (Fig. 10 C)

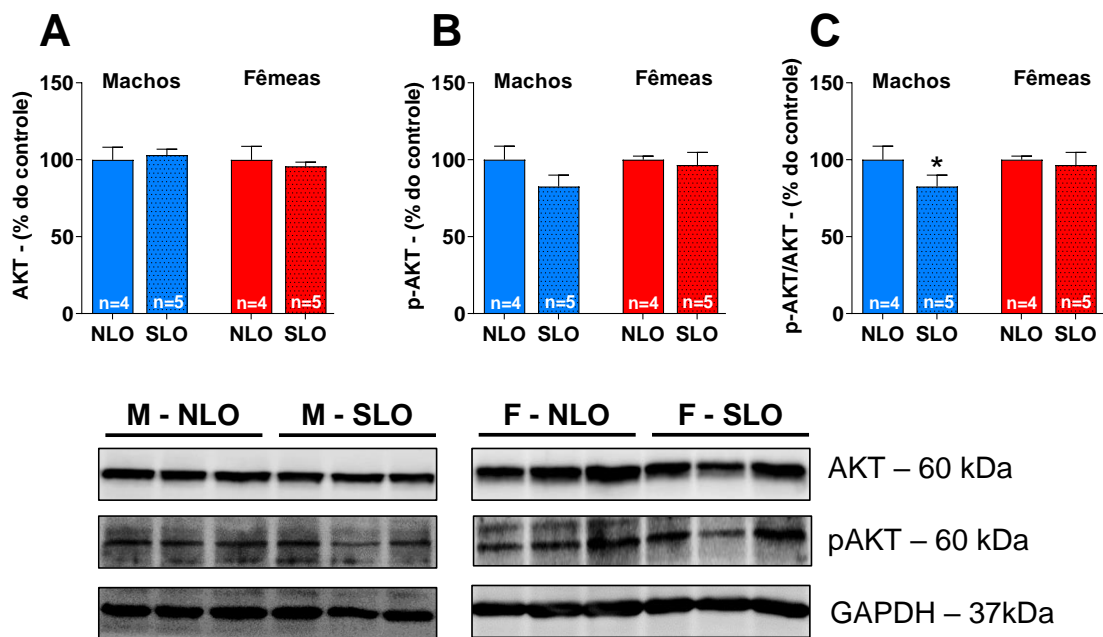


Figura 10. Efeito da superalimentação pós-natal materna (F1) sobre a expressão de sinalizadores da via da insulina no hipotálamo de filhotes (F2) machos e fêmeas aos 120 dias de vida. Expressão proteica da AKT (A), p-AKT (B) e a razão entre p-AKT e AKT (C) no hipotálamo. Imagens representativas das *immunoblots* abaixo dos gráficos. Dados expressos em Média \pm EPM. Teste t-student foi utilizado. * $p < 0,05$ vs NLO.

5. DISCUSSÃO

A superalimentação pós-natal é um modelo bem estabelecido para o estudo dos efeitos do ganho de peso ao longo da vida, que culmina em sobrepeso e obesidade, acompanhado pelo desenvolvimento de outras fisiopatologias como a síndrome metabólica e doenças cardiovasculares. Modelos experimentais que foram submetidos a superalimentação pós-natal possuem massa corporal aumentada antes e após o desmame, são hiperfágicos, possuem maior adiposidade corporal e disfunção cardiovascular, desde idades jovens até a idade adulta (41). Contudo, ainda não é bem elucidado na literatura científica se a prole concebida de animais fêmeas que foram submetidas a superalimentação pós-natal podem programar as próximas gerações a desenvolverem as mesmas condições fisiopatológicas vistas na geração anterior e se, essas condições são moduladas pelo sexo da prole. Desta forma, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a prole de ratas submetidas a superalimentação pós-natal, independente do sexo, tiveram aumento da massa corporal antes e após o desmame, quadro que perdurou até a fase adulta, aos 120 dias de vida.

De maneira semelhante, nosso grupo de pesquisa demonstrou em trabalho anterior, que ambos os filhotes machos e fêmeas de ratas submetidas a superalimentação pós-natal são hiperfágicos, pois aumentam tanto a ingesta de leite materno quanto a ingesta de ração após o desmame (52). A redução de ninhada aumenta a massa corporal, pois ao diminuir a competição entre os filhotes para se alimentarem, proporcionam a eles acesso a uma maior quantidade de alimento logo nos primeiros dias de vida. Além disso, já foi evidenciado que o modelo de superalimentação pós-natal é capaz de alterar a composição do leite materno, aumentando a quantidade de lipídios e, conseqüentemente, o teor calórico, que, por sua vez, pode estar contribuindo com o ganho de massa e adiposidade corporal, além dos quadros de hiperinsulinemia e hiperleptinemia da prole (53,54).

Na vida adulta, ambas proles machos e fêmeas tiveram aumento significativo da adiposidade corporal, o que vai de encontro com outros estudos que demonstraram que a obesidade materna foi capaz de induzir o fenótipo obeso tanto em filhotes machos (55) quanto em fêmeas (56). Somente a prole macho de mães obesas apresentaram aumento do tecido adiposo inguinal, o que já foi observado em outros estudos, onde a prole de fêmeas de mães alimentadas com DHC não

apresentou aumento do tecido adiposo branco peri-renal e, controversamente com nossos resultados, nem do gonadal (57).

A superalimentação pós-natal não alterou significativamente a massa de tecido adiposo marrom na prole de ambos os sexos na vida adulta corroborando com um estudo prévio o qual nem a privação nutricional nem a superalimentação pós-natal foram capazes de alterar a massa do tecido adiposo marrom (58). No entanto, estudos em que a obesidade materna foi induzida por dieta hiperlipídica, houve o aumento da deposição lipídica no tecido adiposo marrom tanto na prole de machos quanto na de fêmeas (59). Embora não avaliado neste estudo, a hiperinsulinemia e hiperleptinemia são fenótipos encontrados por diversos estudos na literatura (60–62), de modo que o desbalanço entre a ação destes hormônios está relacionado com o ganho de massa corporal e adiposidade pelos animais durante o período experimental (15,63). Ademais, a lipólise no tecido adiposo branco também sofre modulação hipotalâmica, por meio da atividade autonômica simpática, de modo que o receptor beta-adrenérgico promove a lipólise e o receptor alfa-2-adrenérgico que a inibe. Alterações no equilíbrio desses neurotransmissores juntamente com as alterações epigenéticas no próprio tecido adiposo tem sido apontado como potenciais fatores que promovem a adipogênese, lipogênese e diminuição da lipólise e da termogênese, portanto, promovendo o aumento da adiposidade corporal (64,65).

Ambas as proles machos e fêmeas (F2) das ratas submetidas a superalimentação pós-natal apresentaram aumento da massa do pâncreas quando comparados aos seus respectivos grupos controle e, este aumento foi acompanhado também pelo aumento da área das ilhotas pancreáticas, evidenciando um remodelamento do pâncreas endócrino na idade adulta. Além do aumento da área também foi observado mudanças estruturais dessas ilhotas. Em geral, ilhotas pancreáticas apresentam certa regularidade morfológica com formato tipicamente esférico, como pode ser claramente observado nos animais dos grupos NLO. Por outro lado, as ilhotas dos filhotes SLO machos e fêmeas apresentam formatos irregulares. Alterações morfológicas do pâncreas endócrino têm sido relatadas em outros estudos (66,67). Foi observado em gerações F1 e F2 em machos concebidos por camundongas com obesidade pré-gestacional induzida por dieta hiperlipídica aumento da massa pancreática, do diâmetro da ilhota pancreática e da massa das células alfa e beta (68). Além disso, outro estudo observou que o consumo de uma

dieta hiperlipídica durante toda a gestação e lactação promoveu efeitos que se distinguiram de acordo com o sexo da prole, de modo que, enquanto a prole fêmea obteve respostas como o aumento da densidade mitocondrial, aumento da expressão do receptor ER- α e a diminuição da expressão de fatores pró-apoptóticos nas ilhotas pancreáticas, a prole de machos apresentou diminuição da atividade mitocondrial e aumento da expressão de fatores pró-apoptóticos (69).

No hipotálamo, a insulina e a leptina possuem um *crosstalk* entre as suas vias, de modo que mensageiros secundários como as proteínas da família dos substratos do receptor de insulina (IRS), o fosfoinositidil-3-fosfato (PI3K) e a proteína quinase B (AKT) participam das vias de ação de ambos hormônios, de modo a promover saciedade e reações anabólicas no metabolismo. Ao investigar a via da insulina no hipotálamo, verificou-se que, a superalimentação pós-natal materna não foi capaz de alterar a expressão da subunidade beta do receptor de insulina (IR- β) nem do substrato do receptor da insulina do tipo 2 (IRS-2) em ambas as proles de machos e fêmeas na vida adulta. Contudo, somente os filhotes machos apresentaram redução na expressão da PI3K e na razão p-AKT/AKT, o que evidencia uma possível desregulação da via da insulina a nível central sexo-específica. Corroborando com estes resultados, uma DHC foi capaz de reduzir a expressão de IR- β , PI3K, e AKT, assim como alterar a expressão dos neuropeptídeos NPY e POMC no hipotálamo (70).

Embora não avaliado demais mensageiros secundários, a participação da PI3K e da AKT na via da leptina e o fato destes terem sua expressão diminuídas, sugere uma possível desregulação também da via da leptina, o que culmina na desregulação dos efeitos de saciedade e corroboraria com a hiperfagia encontrada na prole de machos e fêmeas de mães submetidas a superalimentação pós-natal.

Apesar da superalimentação pós-natal materna não ter sido capaz de alterar a expressão dos mensageiros secundários avaliados a nível hipotalâmico, outros autores também encontraram que apenas os filhotes machos concebidos por mães submetidas a DHC tiveram alterações hipotalâmicas, evidenciando respostas sexo-específicas (71,72). Com base nisso, outros mensageiros e vias precisam ser melhores estudados para elucidar quais os possíveis mecanismos envolvidos na ocorrência dos fenótipos da prole de fêmeas.

6. CONCLUSÃO

Com base nos resultados encontrados, a superalimentação pós-natal materna foi capaz de promover hiperfagia que foi acompanhado pelo ganho de massa e adiposidade corporal em ambas proles de machos e fêmeas até a vida adulta. Além disso, houve alteração do perfil bioquímico apenas dos filhotes machos, apresentando elevação dos níveis plasmáticos de glicose e triglicérides. Além do mais, houve aumento da massa pancreática e da área da ilhota pancreática nas proles machos e fêmeas. Contudo, apenas os filhotes machos apresentaram redução na expressão de mensageiros secundários, AKT e PI3K, no hipotálamo, sugerindo uma possível desregulação sexo-específica das vias da insulina e leptina centralmente.

Estudos futuros ainda se mostram relevantes para melhor compreensão das vias moleculares envolvidas na sinalização da insulina e leptina, assim como no remodelamento das ilhotas pancreáticas e se há mecanismos distintos entre as respostas de machos e fêmeas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Obesity and overweight - Key Facts. [Internet]. 2016 [cited 2022 Feb 17]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
2. ABESO. Mapa da Obesidade [Internet]. 2019 [cited 2022 Feb 17]. Available from: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>
3. Vadiveloo M, Scott M, Quatromoni P, Jacques P, Parekh N. Trends in dietary fat and high-fat food intakes from 1991 to 2008 in the framingham heart study participants. *British Journal of Nutrition*. 2014 Feb 28;111(4):724–34.
4. Hall KD, Kahan S. Maintenance of Lost Weight and Long-Term Management of Obesity. Vol. 102, *Medical Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2018. p. 183–97.
5. Gadde KM, Martin CK, Berthoud HR, Heymsfield SB. Obesity: Pathophysiology and Management. Vol. 71, *Journal of the American College of Cardiology*. Elsevier USA; 2018. p. 69–84.
6. Cox AJ, West NP, Cripps AW. Obesity, inflammation, and the gut microbiota. Vol. 3, *The Lancet Diabetes and Endocrinology*. Lancet Publishing Group; 2015. p. 207–15.
7. Polyzos SA, Kountouras J, Mantzoros CS. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: From pathophysiology to therapeutics. Vol. 92, *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2019. p. 82–97.
8. Singh S, Dulai PS, Zarrinpar A, Ramamoorthy S, Sandborn WJ. Obesity in IBD: Epidemiology, pathogenesis, disease course and treatment outcomes. Vol. 14, *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*. Nature Publishing Group; 2017. p. 110–21.
9. Seravalle G, Grassi G. Obesity and hypertension. Vol. 122, *Pharmacological Research*. Academic Press; 2017. p. 1–7.

10. Kawai T, Autieri M v., Scalia R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 2021 Mar 1;320(3):C375–91.
11. Yadav A, Kataria MA, Saini V, Yadav A. Role of leptin and adiponectin in insulin resistance. Vol. 417, *Clinica Chimica Acta*. 2013. p. 80–4.
12. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet*. 2014;384(9945):766–81.
13. Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology*. 2016 Apr 1;157(4):1328–40.
14. Benyshek DC. The “early life” origins of obesity-related health disorders: New discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. *American Journal of Physical Anthropology*. 2013 Dec;152:79–93.
15. Zambrano E, Ibáñez C, Martínez-Samayoa PM, Lomas-Soria C, Durand-Carbajal M, Rodríguez-González GL. Maternal Obesity: Lifelong Metabolic Outcomes for Offspring from Poor Developmental Trajectories During the Perinatal Period. Vol. 47, *Archives of Medical Research*. Elsevier Inc.; 2016. p. 1–12.
16. Catalano PM, Shankar K. Obesity and pregnancy: mechanisms of short term and long term adverse consequences for mother and child. *BMJ*. 2017 Feb 8;j1.
17. Mariona FG. Perspectives in obesity and pregnancy. *Women’s Health*. 2016 Nov 10;12(6):523–32.
18. Marchi J, Berg M, Dencker A, Olander EK, Begley C. Risks associated with obesity in pregnancy, for the mother and baby: a systematic review of reviews. *Obesity Reviews*. 2015 Aug;16(8):621–38.

19. Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic Syndrome in Childhood: Association With Birth Weight, Maternal Obesity, and Gestational Diabetes Mellitus. *Pediatrics*. 2005 Mar 1;115(3):e290–6.
20. Gaillard R, Felix JF, Duijts L, Jaddoe VWV. Childhood consequences of maternal obesity and excessive weight gain during pregnancy. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*. 2014 Nov;93(11):1085–9.
21. Galliano D, Bellver J. Female obesity: short- and long-term consequences on the offspring. *Gynecological Endocrinology*. 2013 Jul 20;29(7):626–31.
22. Benyshek DC. The “early life” origins of obesity-related health disorders: New discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. *American Journal of Physical Anthropology*. 2013 Dec;152:79–93.
23. BARKER D. INFANT MORTALITY, CHILDHOOD NUTRITION, AND ISCHAEMIC HEART DISEASE IN ENGLAND AND WALES. *The Lancet*. 1986 May;327(8489):1077–81.
24. Barker DJP, Osmond C, Winter PD, Margetts B, Simmonds SJ. WEIGHT IN INFANCY AND DEATH FROM ISCHAEMIC HEART DISEASE. *The Lancet*. 1989 Sep;334(8663):577–80.
25. Barker DJP. The origins of the developmental origins theory. *Journal of Internal Medicine*. 2007 May;261(5):412–7.
26. Barker DJP. Fetal nutrition and cardiovascular disease in later life. *British Medical Bulletin*. 1997 Jan 1;53(1):96–108.
27. Gillman MW, Barker D, Bier D, Cagampang F, Challis J, Fall C, et al. Meeting Report on the 3rd International Congress on Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD). *Pediatric Research*. 2007 May;61(5, Part 1):625–9.
28. Liberman N, Wang SY, Greer EL. Transgenerational epigenetic inheritance: from phenomena to molecular mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*. 2019 Dec;59:189–206.

29. Tang W, Ho S. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*. 2007 Sep 17;8(2):173–82.
30. Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D. Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clinical Science*. 2016 Jun 1;130(12):943–86.
31. Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2018 Dec 13;19(12):774–90.
32. Li G, Saad S, Oliver B, Chen H. Heat or Burn? Impacts of Intrauterine Tobacco Smoke and E-Cigarette Vapor Exposure on the Offspring's Health Outcome. *Toxics*. 2018 Aug 1;6(3):43.
33. Tudurí E, Marroqui L, dos Santos RS, Quesada I, Fuentes E, Alonso-Magdalena P. Timing of Exposure and Bisphenol-A: Implications for Diabetes Development. *Frontiers in Endocrinology*. 2018 Oct 31;9.
34. Ponzo OJ, Silvia C. Evidence of reproductive disruption associated with neuroendocrine changes induced by UV-B filters, phthalates and nonylphenol during sexual maturation in rats of both gender. *Toxicology*. 2013 Sep;311(1–2):41–51.
35. Entringer S, Kumsta R, Hellhammer DH, Wadhwa PD, Wüst S. Prenatal exposure to maternal psychosocial stress and HPA axis regulation in young adults. *Hormones and Behavior*. 2009 Feb;55(2):292–8.
36. Ribeiro TA, Tófolo LP, Martins IP, Pavanello A, de Oliveira JC, Prates KV, et al. Maternal low intensity physical exercise prevents obesity in offspring rats exposed to early overnutrition. *Scientific Reports*. 2017 Dec 9;7(1):7634.
37. Buss C, Lord C, Wadiwalla M, Hellhammer DH, Lupien SJ, Meaney MJ, et al. Maternal Care Modulates the Relationship between Prenatal Risk and Hippocampal Volume in Women But Not in Men. *Journal of Neuroscience*. 2007 Mar 7;27(10):2592–5.

38. Zhang Y-P, Huo Y-L, Fang Z-Q, Wang X-F, Li J-D, Wang H-P, et al. Maternal high-fat diet acts on the brain to induce baroreflex dysfunction and sensitization of angiotensin II-induced hypertension in adult offspring. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2018 May 1;314(5):H1061–9.
39. Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *British Journal of Nutrition*. 2009 Aug 10;102(04):514.
40. Contu L, Hawkes C. A Review of the Impact of Maternal Obesity on the Cognitive Function and Mental Health of the Offspring. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017 May 19;18(5):1093.
41. Habbout A, Li N, Rochette L, Vergely C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *Journal of Nutrition*. 2013 May;143(5):553–62.
42. Junior MDF, Cavalcante KVN, Ferreira LA, Lopes PR, Pontes CNR, Bessa A de SM de, et al. Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats. *Life Sciences*. 2019 Jun 1;226:173–84.
43. Valério Prates K, Ribeiro TA, Pavanello A, Jacinto Saavedra LP, Moreira VM, da Silva Silveira S, et al. Potential attenuation of early-life overfeeding-induced metabolic dysfunction by chronic maternal acetylcholinesterase inhibitor exposure. *Toxicology*. 2019 Sep 1;425.
44. Chavaglia Cavalet L, dos Santos Ribeiro LC, Rosa GB, Sousa KK, de Melo ABS, Campos DBT, et al. Long-term effects of early overfeeding and food restriction during puberty on cardiac remodeling in adult rats. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2020 Oct 11;11(5):492–8.
45. Schellong K, Melchior K, Ziska T, Henrich W, Rancourt RC, Plagemann A. Sex-specific epigenetic alterations of the hypothalamic *Agrp-Pomc* system do not explain ‘diabesity’ in the offspring of high-fat diet (HFD) overfed maternal rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2020 Jan;75:108257.

46. Rodrigo S, Fauste E, de la Cuesta M, Rodríguez L, Álvarez-Millán JJ, Panadero MI, et al. Maternal fructose induces gender-dependent changes in both LXR α promoter methylation and cholesterol metabolism in progeny. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018 Nov;61:163–72.
47. Khamoui A v., Desai M, Ross MG, Rossiter HB. Sex-specific effects of maternal and postweaning high-fat diet on skeletal muscle mitochondrial respiration. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2018 Dec 16;9(6):670–7.
48. Glendining KA, Fisher LC, Jasoni CL. Maternal high fat diet alters offspring epigenetic regulators, amygdala glutamatergic profile and anxiety. *Psychoneuroendocrinology*. 2018 Oct;96:132–41.
49. Dias-Rocha CP, Almeida MM, Santana EM, Costa JCB, Franco JG, Pazos-Moura CC, et al. Maternal high-fat diet induces sex-specific endocannabinoid system changes in newborn rats and programs adiposity, energy expenditure and food preference in adulthood. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 2018 Jan;51:56–68.
50. Denisova EI, Kozhevnikova V v., Bazhan NM, Makarova EN. Sex-specific effects of leptin administration to pregnant mice on the placentae and the metabolic phenotypes of offspring. *FEBS Open Bio*. 2020 Jan 25;10(1):96–106.
51. Dearden L, Balthasar N. Sexual dimorphism in offspring glucose-sensitive hypothalamic gene expression and physiological responses to maternal high-fat diet feeding. *Endocrinology*. 2014;155(6):2144–54.
52. 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. 2019.
53. Capriglioni Cancian CR, Leite NC, Montes EG, Fisher SV, Waselcoski L, Lopes Stal EC, et al. Histological and Metabolic State of Dams Suckling Small Litter or MSG-Treated Pups. *The Scientific World Journal*. 2016;2016:1–12.

54. Plagemann A, Heidrich I, Götz F, Rohde W, Dörner G. Obesity and Enhanced Diabetes and Cardiovascular Risk in Adult Rats due to Early Postnatal Overfeeding. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 2009 Jul 16;99(03):154–8.
55. Desai M, Ross M. Fetal Programming of Adipose Tissue: Effects of Intrauterine Growth Restriction and Maternal Obesity/High-Fat Diet. *Seminars in Reproductive Medicine*. 2011 May 27;29(03):237–45.
56. Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Beltrán AA, Ibáñez CA, Vega CC, et al. Maternal obesity accelerates rat offspring metabolic ageing in a sex-dependent manner. *The Journal of Physiology*. 2019 Dec 11;597(23):5549–63.
57. Lecoutre S, Deracinois B, Laborie C, Eberlé D, Guinez C, Panchenko PE, et al. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *Journal of Endocrinology*. 2016 Jul;230(1):39–53.
58. Muñoz-Valverde D, Rodríguez-Rodríguez P, Gutierrez-Arzapalo PY, López De Pablo AL, González MC, López-Giménez R, et al. Effect of fetal undernutrition and postnatal overfeeding on rat adipose tissue and organ growth at early stages of postnatal development. *Physiological Research*. 2015;64(4):547–59.
59. Almeida MM, Dias-Rocha CP, Souza AS, Muros MF, Mendonca LS, Pazos-Moura CC, et al. Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. *British Journal of Nutrition*. 2017 Nov 28;118(10):788–803.
60. Graus-Nunes F, Dalla Corte Frantz E, Lannes WR, da Silva Menezes MC, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Pregestational maternal obesity impairs endocrine pancreas in male F1 and F2 progeny. *Nutrition*. 2015 Feb 1;31(2):380–7.
61. Padmanabhan V, Cardoso RC, Puttabyatappa M. Developmental Programming, a Pathway to Disease. *Endocrinology* [Internet]. 2016

- Apr;157(4):1328–40. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2016-1003>
62. Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. *Experimental Physiology* [Internet]. 2007 Mar 1;92(2):287–98. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/expphysiol.2005.032854>
 63. Dearden L, Buller S, Furigo IC, Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Maternal obesity causes fetal hypothalamic insulin resistance and disrupts development of hypothalamic feeding pathways. *Molecular Metabolism*. 2020 Dec 1;42.
 64. Lecoutre S, Pourpe C, Butruille L, Marousez L, Laborie C, Guinez C, et al. Reduced PPAR γ 2 expression in adipose tissue of male rat offspring from obese dams is associated with epigenetic modifications. *The FASEB Journal*. 2018 May 8;32(5):2768–78.
 65. Lukaszewski M-A, Eberlé D, Vieau D, Breton C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013 Nov 15;305(10):E1195–207.
 66. Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, Bonner-Weir S, Sharma A. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes. *Diabetes*. 2001 Feb 1;50(suppl_1):S154.
 67. Zhang S, Liu J, Saafi 'Etuete L., Cooper GJS. Induction of apoptosis by human amylin in RINm5F islet β -cells is associated with enhanced expression of p53 and p21^{WAF1/CIP1}. *FEBS Letters*. 1999 Jul 23;455(3):315–20.
 68. Graus-Nunes F, Dalla Corte Frantz E, Lannes WR, da Silva Menezes MC, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Pregestational maternal obesity impairs endocrine pancreas in male F1 and F2 progeny. *Nutrition*. 2015 Feb 1;31(2):380–7.
 69. Nicholas LM, Nagao M, Kusinski LC, Fernandez-Twinn DS, Eliasson L, Ozanne SE. Exposure to maternal obesity programs sex differences in pancreatic islets of the offspring in mice. *Diabetologia*. 2020 Feb 1;63(2):324–37.

70. Gomes RM, Bueno FG, Schamber CR, de Mello JCP, de Oliveira JC, Francisco FA, et al. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *Journal of Nutritional Biochemistry* [Internet]. 2018;61:24–32. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.006>
71. Bae-Gartz I, Janoschek R, Breuer S, Schmitz L, Hoffmann T, Ferrari N, et al. Maternal Obesity Alters Neurotrophin-Associated MAPK Signaling in the Hypothalamus of Male Mouse Offspring. *Frontiers in Neuroscience*. 2019 Sep 13;13.
72. Chen N, Zhang Y, Wang M, Lin X, Li J, Li J, et al. Maternal obesity interrupts the coordination of the unfolded protein response and heat shock response in the postnatal developing hypothalamus of male offspring in mice. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2021 May;527:111218.