



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Fernanda Ornellas Pinto da Cruz

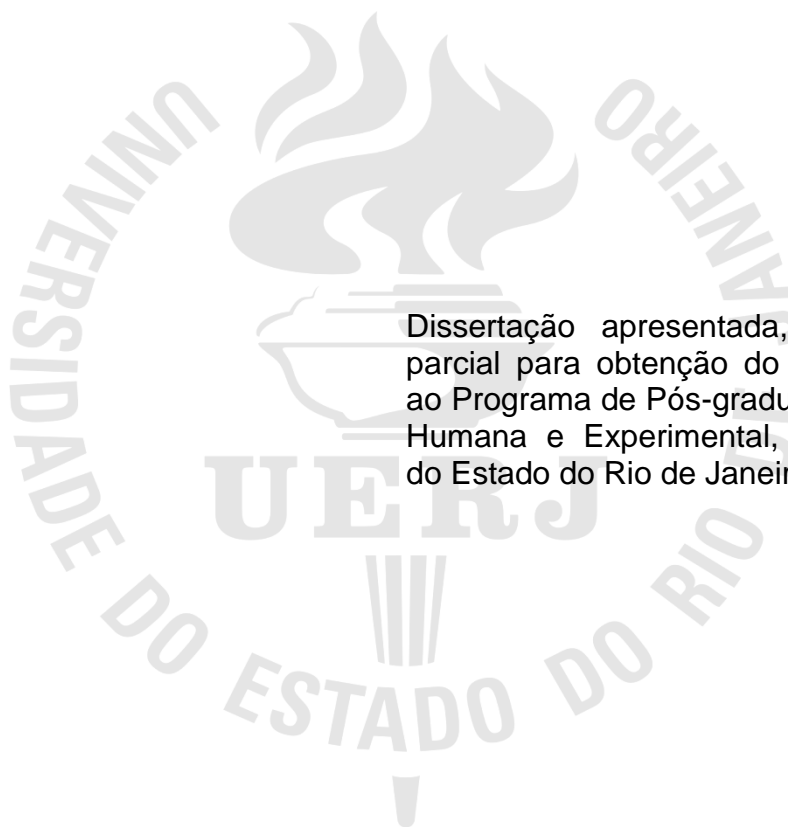
Mães obesas, filhotes obesos: estudo experimental

Rio de Janeiro

2012

Fernanda Ornellas Pinto da Cruz

Mães obesas, filhotes obesos: estudo experimental



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarim-de-Lacerda

Coorientadora: Prof.^a Dra. Vanessa Souza Mello

Rio de Janeiro

2012

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

C957 Cruz, Fernanda Ornellas Pinto da.
Mães obesas, filhotes obesos: estudo experimental / Fernanda Ornellas Pinto da Cruz. – 2012.
71f.

Orientadora: Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda.

Coorientadora: Vanessa Souza Mello.

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Obesidade - Teses. 2. Adiposidade - Teses. 3. Dimorfismo sexual (Animais) - Teses. 4. Adipocinas. I. Mandarin-de-Lacerda, Márcia Barbosa Águila. II. Mello, Vanessa Souza. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 616-056.52

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Fernanda Ornellas Pinto da Cruz

Mães obesas, filhotes obesos: estudo experimental

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 25 de julho de 2012.

Coorientadora:

Prof.^a Dra. Vanessa Souza Mello
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Márcia Barbosa Águila Mandarin de Lacerda (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Cristiane Matsuura
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Lucia Gomes Rodrigues
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2012

DEDICATÓRIA

Dedico à minha querida família, sem a qual não teria tido forças para prosseguir no caminho em busca do conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A minha família, pais, tios e irmã Viviane por todo carinho, paciência, palavras de incentivo e AMOR. Obrigada por tudo, vocês são a minha vida.

A professora Márcia Barbosa Águila Mandarin-de-Lacerda por ter propiciado meu crescimento intelectual e pessoal. Sem o seu exemplo certamente este trabalho não teria o mesmo brilho e valor científico.

A professora Vanessa de Souza Mello por ter sido amiga, incentivadora e ao mesmo tempo, coorientadora. Vanessa, a tua presença ao meu lado me deu confiança para alcançar alturas maiores. Agradeço também a professora Bianca Gregório pela inspiração na arte da escrita, pelo carinho e atenção dispensados desde o momento da iniciação científica.

Aos meus queridos amigos Diana Moraes, D'angelo Magliano, Débora Silva e Thereza Bargut. Foram vocês que iluminaram este laboratório com a alegria, responsabilidade e amizade infindáveis. Agradeço pelas palavras de carinho, estímulo e risadas, as quais tornaram a minha vida mais leve e agradável.

A minha aluna de iniciação científica Raquel Nigre pelo companheirismo e confiança. Obrigada por ter me permitido transmitir o que outrora aprendi.

As amigas Eliete Dalla Corte Frantz, Isabele Bringhenti e Marcela Anjos pelos momentos de motivação e sabedoria.

Aos companheiros do LMMC Alini Schultz, Fernanda Amorim, Sandra Barbosa, Liliane Soares, André Vianna, Flavia Lima, Victor Motta, Durval Marques, Francielle Graus, Jéssica Teixeira, Tatiane Faria, Jorge Alves, Fernanda Cavalcante, Flavia Gombar e professora Cristiane Ramos.

As técnicas e amigas Tathiany Marinho e Aline Penna, por toda assistência durante o desenvolvimento desse trabalho.

As minhas amigas inseparáveis, que foram fundamentais para o meu desenvolvimento: Emilia Magalhães, Elaine Nunes, Vivian Mello, Fabiana Neves Erika Venceslau. Amo vocês!

Há pessoas que transformam o sol numa
simples mancha amarela. Mas há, também, aquelas que
fazem de uma simples mancha amarela, o próprio Sol.

Pablo Picasso

RESUMO

CRUZ, Fernanda Ornellas Pinto da. *Mães obesas, filhotes obesos: estudo experimental*. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

O aumento da obesidade materna pode refletir em efeitos deletérios na prole adulta, manifestos diferentemente de acordo com o gênero do indivíduo. Este trabalho teve como objetivo verificar a hipótese de que a obesidade materna provoca alterações metabólicas, na estrutura do tecido adiposo e hepático e mudanças de perfil inflamatório nas proles adultas de machos e fêmeas. Fêmeas C57BL/6 receberam dieta padrão (SC, 17% da energia proveniente do lipídeo) ou dieta hiperlipídica (HF; 49% da energia proveniente do lipídeo) durante oito semanas pré-gestacionais até a lactação. Após o desmame, os filhotes foram divididos nos grupos: SCM (machos), SCF (fêmeas), HFM (machos) e HFF (fêmeas). As características metabólicas foram avaliadas pela massa corporal (MC), glicemia de jejum, área sob a curva no teste oral de tolerância a glicose; concentrações de triglicerídeos (TG) hepáticos e estimativa da esteatose hepática; análise plasmática de insulina, colesterol total (CT), triglicerídeos (TG) e adipocinas; distribuição e análise morfológica do tecido adiposo e estado pró-inflamatório dos filhotes. Diferenças entre os grupos foram analisadas pelo Teste T não pareado (dados entre progenitoras e pares de grupos nas proles); *one-way* ANOVA com pós-teste de *Tukey* (para proles) e *two-way* ANOVA (efeito da dieta materna e gênero). O nível de significância adotado foi de $P \leq 0,05$. Progenitoras HF tiveram maior MC (+20%), glicemia elevada (+22%) e intolerância à glicose em comparação ao grupo SC. A partir da quarta semana, a MC mostrou-se maior nas proles HF, em ambos os gêneros, quando comparados às proles SC. Na 12^a semana, a MC foi 20% maior no grupo HF macho e 30% maior no grupo HF fêmea do que seus controles ($p < 0,0001$, ambos os gêneros). Intolerância à glicose foi observada em machos e fêmeas HF em relação aos seus contrapares SC (+20%, $p < 0,05$). Proles HF demonstraram hepatomegalia com maior acúmulo de TG hepático, resultando em maior percentual de esteatose em machos (27%) e fêmeas HF (25%). Proles HF apresentaram incremento na adiposidade (+20%) e nos níveis de CT e TG do que seus congêneres SC. Níveis plasmáticos de leptina e insulina foram maiores, enquanto houve diminuição da adiponectina no grupo HF macho em relação ao grupo SC macho. Hipertrofia de adipócitos foi observada nas proles HF. TNF-alfa, IL-6 e leptina foram mais expressos em proles HF, porém diminuição na expressão de adiponectina foi evidenciada nas proles geradas por mães obesas. A luz do exposto, a dieta HF administrada em mães antes e durante períodos de gestação e lactação leva à obesidade materna que tem consequências na prole, tais como remodelamento do tecido adiposo, juntamente com alterações bioquímicas metabólicas dos adipócitos, intensificando o estado pró-inflamatório da prole, em ambos os gêneros, na idade adulta.

Palavras-chave: Obesidade materna. Programação materna. Dimorfismo sexual. Fígado. Adipocinas. Tecido adiposo.

ABSTRACT

CRUZ, Fernanda Ornellas Pinto da. *Obese mothers, obese offspring: experimental study*. 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Maternal obesity is increasing in prevalence, reflecting in gender-related deleterious effects in offspring in adulthood. This work aimed to verify the hypothesis that maternal obesity causes metabolic abnormalities, alterations in structure of the liver and adipose tissue and pro-inflammatory profile changes in adult offspring of males and females. Pregnant C57BL / 6 mice received standard chow (SC; 17% energy from fat) or high fat diet (HF; 49% energy from fat) for eight weeks pre-pregnancy until lactation. After weaning, offspring were divided into groups, according to diet of dams: SCM (male), SCF (female), HFM (male) and HFF (female). The metabolic characteristics were evaluated by the curve of body mass (BM), fasting glucose, area under the curve after oral glucose tolerance test, hepatic triglyceride and estimation of hepatic steatosis, analysis of plasma insulin, total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and adipokines; distribution and morphological analysis of adipose tissue and pro-inflammatory state of the offspring. Differences between groups were analyzed by unpaired t test (data between progenitor and offspring groups in pairs), one-way ANOVA with Tukey post-test (for offspring) and two-way ANOVA to determine the effect of maternal diet and gender. The level of significance adopted was $P \leq 0.05$. Dams fed HF diet had greater BM (+20%), increased blood glucose (+22%) and glucose intolerance than SC dams. In the offspring, BM was greater in HF offspring than SC offspring, both genders, since the fourth week of age. At 12th week, BM was 20% greater in HF male and 30% greater in HF female than in their SC counterparts ($P < 0.0001$, both genders). Glucose intolerance was observed in both male and female HF offspring compared with their relative SC ones (+20%; $P < 0.05$). HF offspring showed hepatomegaly with increased liver triglyceride accumulation, which resulted in a greater percentage of steatosis in male (27%) and in female HF (25%). HF offspring had 20% greater adiposity and higher levels of TC and TG than SC counterparts. Leptin and insulin plasma levels were higher and adiponectin level was lower in HF male than in SC male. Adipocytes were much bigger in HF offspring than in SC offspring. TNF-alpha, IL-6 and leptin protein were significantly more expressed in HF than in SC offspring, but the contrary happened with adiponectin protein expression. HF diet administrated to mice females prior and during gestation and lactation periods leads to maternal obesity that has consequences in the offspring, such as adipose tissue remodeling together with biochemical and metabolic changes of adipocytes, intensifying the pro-inflammatory state in both genders offspring in adulthood.

Keywords: Maternal obesity. Fetal programming. Sexual dimorphism. Liver. Adipokines. Adipose tissue.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Efeitos da programação fetal na prole.....	18
Figura 2 -	Ações das adipocinas secretadas pelo tecido adiposo em órgãos distintos.....	22
Figura 3 -	Desenho experimental.....	29
Figura 4 -	Área seccional média dos adipócitos obtida pelo <i>software Image Pro Plus</i>	33
Figura 5 -	Ganho ponderal total das progenitoras dos grupos SC e HF durante todo o período experimental.....	35
Figura 6 -	Evolução da massa corporal das proles de machos e fêmeas.....	38
Figura 7 -	Área sob a curva do Teste oral de tolerância à glicose das proles de machos e fêmeas.....	40
Figura 8 -	Densidade de volume de esteatose (%) e triglicerídeo hepático das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	44
Figura 9 -	Fotomicrografias do fígado das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	45
Figura 10 -	Distribuição dos compartimentos de gordura corporal das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	46
Figura 11 -	Relação entre os compartimentos de gordura genital e inguinal das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	47
Figura 12 -	Área seccional média dos adipócitos das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	48
Figura 13 -	Fotomicrografias do tecido adiposo das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	49
Figura 14 -	Expressão de TNF- α no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	50
Figura 15 -	Expressão de IL-6 no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	51
Figura 16 -	Expressão de adiponectina no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas.....	52
Figura 17 -	Expressão de leptina no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Composição das dietas experimentais.....	28
Tabela 2-	Parâmetros biométricos e bioquímicos das mães SC e HF	36
Tabela 3-	Parâmetros avaliados nas proles submetidas a diferentes rotinas dietéticas	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Ácidos graxos
AGL	Ácido graxo livre
AUC	Área sob a curva
CT	Comprimento da tíbia
DCV	Doenças cardiovasculares
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
HE	Hematoxilina-eosina
HF	Dieta hiperlipídica, <i>high fat</i>
IL-6	Interleucina-6
PAI-1	<i>Plasminogen activador inhibitor 1</i>
SC	Dieta padrão, <i>standard chow</i>
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marrom
TASA	Tecido adiposo subcutâneo abdominal
TASG	Tecido adiposo subcutâneo glúteo-femural
TAV	Tecido adiposo visceral
TG	Triglicérides
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TOTG	Teste oral de tolerância à glicose
UCP 1	<i>Uncoupling protein 1</i>
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade
Vv	Densidade de volume

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	12
1	REVISÃO DA LITERATURA	15
1.1	Programação fetal	15
1.1.1	<u>Programação da função hepática</u>	19
1.1.2	<u>Programação do tecido adiposo</u>	20
1.1.3	<u>Programação e diferenças sexuais</u>	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	Gerais	26
2.2	Específicos	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Animais e Dieta	27
3.2	Massa corporal, ingestão alimentar e energética	29
3.3	Glicemia de jejum e teste oral de tolerância à glicose	30
3.4	Eutanásia	30
3.5	Análises plasmáticas	31
3.6	Fígado: triglicérides e esteatose	32
3.7	Morfometria de adipócitos	32
3.8	Expressão de adipocinas no tecido adiposo genital	33
3.9	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35
4.1	Dados maternos	35
4.2	Dados das proles	37
4.2.1	<u>Massa corporal, ingestão alimentar e energética</u>	37
4.2.2	<u>Teste oral de tolerância à glicose</u>	39
4.2.3	<u>Análises plasmáticas</u>	41
4.2.4	<u>Fígado</u>	43
4.2.5	<u>Depósitos de gordura</u>	46
4.2.6	<u>Adipócitos</u>	48
4.2.7	<u>Expressão de adipocinas do tecido adiposo genital</u>	50
5	DISCUSSÃO	54
	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60

INTRODUÇÃO

A obesidade e suas comorbidades associadas caracterizam um quadro de pandemia no mundo ocidental, visto que a atual abundância nutricional aliada a um estilo de vida sedentário tornam-se cada vez mais comum entre crianças e adultos (Kimm e Obarzanek, 2002; Alberti *et al.*, 2006). O aumento na prevalência da obesidade não vem ocorrendo somente em países desenvolvidos como os Estados Unidos e Inglaterra, mas também em países em desenvolvimento, como o Brasil (de Onis e Blossner, 2000). A obesidade, uma vez instalada, reduz a flexibilidade metabólica e aumenta a degeneração de tecidos e órgãos, que combinada com o envelhecimento, intensifica significativamente a prevalência de doenças não transmissíveis (Popkin, 2006; Smyth e Heron, 2006).

Nesse contexto nefasto, o excesso de peso materno pode ter um papel direto na transmissão de um traço obesogênico e diabetogênico de geração para geração (Catalano e Ehrenberg, 2006). Gestantes obesas ou com sobrepeso normalmente consomem dietas hiperenergéticas, ricas em lipídeos e hidratos de carbono simples (Lambin *et al.*, 2007). Assim, cria-se um “círculo vicioso” difícil de ser rompido, com mulheres obesas que geram bebês com maior probabilidade de desenvolverem obesidade e diabetes mellitus na fase adulta (Zhang *et al.*, 2005; Cambonie *et al.*, 2007).

O processo pelo qual os fatores que atuam no início da vida influenciam a saúde da prole quando adulta é definido como programação, sendo considerado um mecanismo chave para o desenvolvimento de obesidade e outras comorbidades nos descendentes (Barker, 1998; Langley-Evans e McMullen, 2010).

Desta forma, existem hipóteses que tentam elucidar como a obesidade materna pode programar a prole. Nesta vertente, os mecanismos epigenéticos tem merecido destaque na literatura (Seki *et al.*, 2012). Estudos experimentais mostram que a nutrição perinatal e o estado energético materno podem induzir mudanças epigenéticas nos filhotes, resultando em alterações na expressão de genes relacionados ao metabolismo energético e obesidade em longo prazo (Laraia *et al.*, 2007; Sullivan e Grove, 2010). Essas mudanças são expressas de acordo com o gênero do indivíduo, ratificando, com isto, notório dimorfismo sexual que justifica, inclusive, diferenças na manifestação das doenças, condizentes com a intensidade e

momento de exarcebção dos sinais patológicos (Looijenga *et al.*, 1999; Reik e Lewis, 2005; Clifton, 2010). A mudança no metabolismo gestacional materno pode afetar o desenvolvimento placentário e embrionário, culminando com maior influxo de nutrientes via placenta para o feto, fato que influenciará o crescimento fetal e evoluindo com adaptações irreversíveis na estrutura e função de órgãos, como fígado e tecido adiposo, que são manifestadas majoritariamente na vida adulta (Bruce *et al.*, 2009; Gregorio *et al.*, 2010).

Neste sentido, o fígado por desempenhar papel central no controle metabólico é visto como um órgão alvo no caso de excesso alimentar, resultando em acúmulo principalmente de triglicérides nos hepatócitos (Torres *et al.*, 2012), processo patológico conhecido como esteatose hepática, e que é apontado como característica típica da síndrome metabólica (Marchesini *et al.*, 2001; Fraulob *et al.*, 2010). Pesquisadores documentam que a administração neonatal de dieta hiperlipídica promove aumento no tamanho do fígado e acúmulo de gotículas de gordura, configurando o quadro de esteatose ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) (Bayol *et al.*, 2010; Oben *et al.*, 2010). Embora esta característica seja inicialmente benigna e assintomática, a esteatose hepática representa a lesão primária para o desenvolvimento de entidades patológicas mais graves como a cirrose hepática e o hepatocarcinoma (Paredes *et al.*, 2012).

Em relação ao tecido adiposo, o meio mais eficaz para "armazenar" energia sob a forma de triglicérides, é capaz de exercer papel como órgão secretor e endócrino, corroborado com a descoberta da leptina (Zhang *et al.*, 1994). O tecido adiposo tem relevante função endócrina e multifuncional, mantendo estreita comunicação com os demais órgãos e sistemas orgânicos, através de liberação de moléculas bioativas, tais como leptina, adiponectina, interleucina (IL)-6, fator de necrose tumoral (TNF)- α , entre outros peptídeos, conhecidos como adipocinas (Hauner, 2004; Havel, 2004). Desta forma, uma secreção alterada dos peptídeos supracitados, consequentes à hipertrofia e/ou hiperplasia das células adiposas, poderia constituir situação relacionada à gênese do processo fisiopatológico da obesidade e suas complicações (Ouchi *et al.*, 2012).

Os efeitos da programação metabólica pela dieta materna hiperlipídica são vastamente discutidos no âmbito científico, todavia são escassos os estudos que diferenciam estas adaptações irreversíveis de acordo com o gênero do indivíduo acometido, suscitando questionamentos acerca do tema. Diante do exposto, a

hipótese deste trabalho é que a obesidade materna pode provocar nos filhotes um efeito obesogênico, com desenvolvimento de resistência à insulina, modificações na resposta inflamatória e alterações estruturais do tecido adiposo e hepático. Assim, será avaliado se a obesidade materna pode influenciar o fígado, a morfologia dos adipócitos e o perfil metabólico e secretor do tecido adiposo na prole. Justificado pelo contexto atual dos países em desenvolvimento com prevalência crescente da obesidade e doenças associadas faz-se imprescindível elucidar como a programação materna através de dieta hiperlipídica pode afetar a prole, distintamente de acordo com o gênero.

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Programação fetal

A partir do momento da concepção, a vida futura de um indivíduo é definida e estabelecida pelas condições nas quais se dá o seu desenvolvimento. A divisão celular inicial, implantação do blastocisto no endométrio materno e etapas posteriores são diretamente influenciadas pela quantidade e qualidade da nutrição materna, possibilitada através da interface materno-fetal, isto é, a placenta (Constancia *et al.*, 2005). Demandas fetais não atingidas por meio do fornecimento de nutrientes maternos inadequados podem prejudicar a trajetória de crescimento fetal e a saúde do indivíduo gerado (Zambrano *et al.*, 2006; Qasem *et al.*, 2012). Inversamente, a disponibilidade do substrato materno que excede os requisitos fetais também pode ocasionar desvios nos padrões fisiológicos de crescimento e assim conferir a evolução das doenças ao longo da vida (Krasnow *et al.*, 2011; Volpato *et al.*, 2012).

Entende-se por “programação fetal” o fenômeno através do qual um insulto ou dano sofrido durante um período crítico do desenvolvimento, como gestação e/ou lactação, resulta em modificação do padrão de crescimento e formação de órgãos centrais do metabolismo, produzindo alterações morfológicas, fisiológicas e metabólicas permanentes. Em longo prazo suas consequências são irreparáveis e irreversíveis, sendo observadas na vida adulta mesmo na interrupção do estímulo desencadeante do mecanismo adaptativo (Lucas, 1991; Barker, 1995; Barker e Clark, 1997).

A idéia de que as condições de saúde da mãe podem ter importantes implicações para a vida futura do bebê não é recente, uma vez que as desigualdades sociais e geográficas da população mundial sempre foram objeto de debate e estudo científico. David Barker e colaboradores sugeriram que a pobreza, má nutrição e saúde geral das mães repercutiam em altas taxas de mortalidade infantil, assim como maior risco de doença cardíaca coronariana ao longo da vida dos filhos (Barker e Osmond, 1986). Posteriormente, estudos *coortes* detalharam a relação entre baixo peso ao nascer e subsequente doença cardiovascular (DCV) no adulto, o

que resultou então na conceituação da Hipótese de Barker à luz da programação fetal (Barker *et al.*, 1990; Barker *et al.*, 1993).

Atualmente observa-se uma transição nutricional no âmbito mundial, caracterizada pelo aumento do número de indivíduos com excesso de peso e obesidade em detrimento da desnutrição, condição facilitada por inúmeros fatores, dentre os quais merecem destaque a redução na prática de atividade física e/ou aumento do consumo de dietas ricas em gordura e em hidratos de carbono simples (Kasuga, 2006; Keding *et al.*, 2011). Assim, a obesidade pode ter a sua origem datando de períodos embrionários (Armitage *et al.*, 2004; Fox e Hillsdon, 2007; Taylor e Poston, 2007; Anderssen *et al.*, 2008) e evidencia-se cada vez mais que os efeitos da dieta materna e a obesidade durante a gestação são relevantes e podem resultar em um modelo de programação metabólica (Charlton, 2009; Dunn e Bale, 2009).

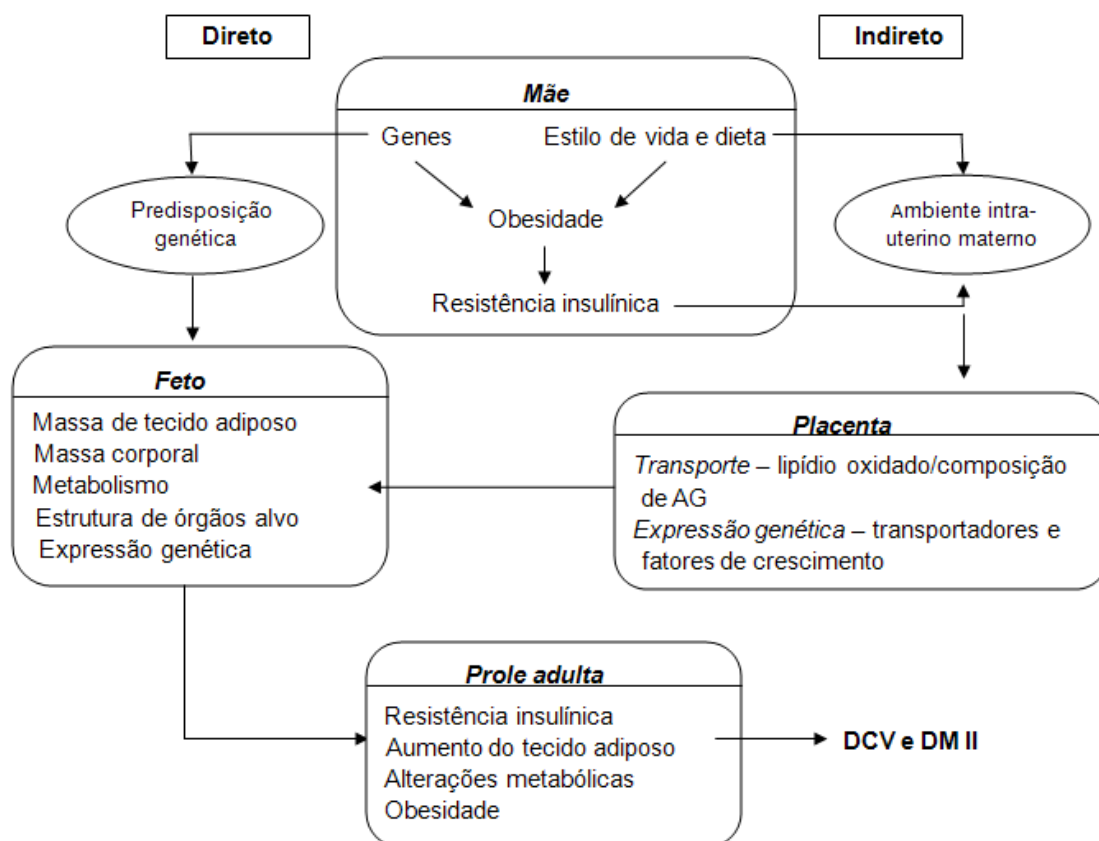
A partir destas observações diversos paradigmas vêm sendo empregados visando à obtenção de modelos experimentais viáveis, objetivando mimetizar o que ocorre em seres humanos. Em animais, a oferta de uma dieta hiperlipídica (*high-fat*, HF) durante a gravidez e a lactação é um método comum para provocar anormalidades metabólicas na prole. Além disso, a composição dos ácidos graxos (AGs) da dieta é determinante para a programação fetal, em particular o excesso de gorduras saturadas (Siemelink *et al.*, 2002; Korotkova *et al.*, 2005). Contudo, a duração da exposição, o percentual de calorias proveniente dos lipídeos e a composição da dieta são variáveis entre os estudos, o que gera diferentes fenótipos nas proles (Sullivan *et al.*, 2011).

Um dos primeiros estudos relacionando hiperalimentação materna e programação das proles foi feito com babuínos e mostrou que a alimentação materna em excesso no período pré-desmame resultou em aumento da adiposidade através da hipertrofia das células adiposas (Lewis *et al.*, 1986). Em um trabalho prévio do nosso grupo, no qual camundongas receberam dieta hiperlipídica (com 49% da energia proveniente dos lipídeos) durante a gravidez e/ou lactação, os filhotes adultos machos apresentaram esteatose hepática, alteração no metabolismo dos carboidratos, resistência à insulina (Gregorio *et al.*, 2010) e acúmulo de gordura no pâncreas (Gregorio *et al.*, 2012).

Evidências indicam que fatores presentes na circulação materna, tais como nutrientes (AGs, triglicérides e glicose), hormônios (leptina e insulina) e citocinas pró-

inflamatórias oriundas do tecido adiposo da mãe, podem estar relacionados na gênese de doenças crônicas na prole (Sullivan *et al.*, 2011). Por exemplo, alterações nos transportadores placentários, promovendo maior influxo de nutrientes para o feto constituem um importante mecanismo da associação da nutrição materna com a obesidade futura na prole (Jones *et al.*, 2009). A programação por dieta hiperlipídica também altera o eixo hipotalâmico, envolvido na regulação do comportamento alimentar (Beck *et al.*, 2006) (Figura 1).

Figura 1 - Efeitos da programação fetal na prole



Legenda: Composição corporal fetal, metabolismo e expressão dos genes podem ser influenciados pela mãe, propiciando o desenvolvimento futuro da obesidade e comorbidades na descendência. Para tal, influências diretas incluem predisposição genética, enquanto influências indiretas incluem o ambiente metabólico intrauterino, determinado pelo estilo de vida, dieta e metabolismo materno, além dos processos de transporte placentário, que podem estar alterados, culminando então, na programação deletéria da prole. Legenda: DCV - doença cardiovascular; AG - ácido graxo; DM II - diabetes mellitus tipo 2

Fonte: Freeman, 2010.

1.1.1 Programação da função hepática

O fígado desempenha papel central no controle da homeostase glicêmica e está sujeito a uma regulação complexa por substratos, insulina e outros hormônios. A dieta hiperlipídica materna durante períodos críticos do desenvolvimento resulta no surgimento de alterações morfológicas e estruturais no fígado, o que pode culminar em prejuízo da sua função em longo prazo. A administração neonatal de dieta HF promove aumento no tamanho do fígado e acúmulo de gotículas de gordura, configurando uma condição patológica conhecida como esteatose hepática (Bayol *et al.*, 2010; Gregorio *et al.*, 2010; Oben *et al.*, 2010).

A esteatose hepática ou doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) é um termo clínico dado a mudanças estruturais, que podem evoluir para esteatohepatite não alcoólica, progredindo para fibrose, carcinoma hepatocelular e falência hepática (Charlton, 2004).

Em hepatócitos saudáveis, os ácidos graxos (AG) são oxidados por enzimas em peroxissomos, mitocôndrias e retículo endoplasmático (microsossomos) (Musso *et al.*, 2009). Entretanto, alterações moleculares e fisiológicas da resistência insulínica resultam em acúmulo excessivo de triglicérides no hepatócito, ocasionado pelo aumento do fornecimento e síntese de gordura, redução da oxidação lipídica e/ou redução da exportação lipídica na forma de lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) (Browning e Horton, 2004). Este quadro estabelecido implica na patogênese da esteatose hepática, uma vez que a entrada (“*input*”) de lipídeo no sistema excede a capacidade de oxidação ou exportação de AG (“*output*”) (Pettinelli *et al.*, 2011).

O aumento do *input* de AGs encontra-se intimamente relacionado à obesidade centrípeta e à diminuição da sensibilidade a insulina (Byrne *et al.*, 2009). Com isto, a hiperinsulinemia exerce efeitos antagônicos no tecido adiposo e no fígado (Mlinar e Marc, 2011). A resistência insulínica age nos adipócitos estimulando a lipólise, com maior liberação de AGs para o fígado, enquanto no hepatócito, há inibição da beta oxidação dos AGs, situação que promove maior captação e menor remoção dos AGs no fígado (Festi *et al.*, 2004).

Adultos saudáveis apresentam 5% da massa hepática ocupada por lipídeo, alocado em vesículas citoplasmáticas, diferentemente caracterizadas de acordo com

sua forma morfológica, podendo ser micro ou macro-vesicular (Burt *et al.*, 1998). Na esteatose micro-vesicular, o lipídeo é estocado em pequenas e múltiplas vesículas, configurando um perfil extremamente deletério ao indivíduo, podendo progredir para necrose do hepatócito (Sherlock, 1983). Enquanto na esteatose macro-vesicular o lipídeo é armazenado em uma única e grande vesícula, o que desloca o núcleo do hepatócito para a periferia da célula (Oleszczuk *et al.*, 2007), conferindo uma condição benigna, com possibilidade de ser revertida (Sherlock, 1995).

Uma das explicações para essas alterações é a disfunção mitocondrial. Sabe-se que as mitocôndrias hepáticas são de origem materna e, como tal, podem ser um alvo importante na investigação das perturbações metabólicas na prole de mulheres obesas, corroborado pelo fato de constituírem um local crítico do metabolismo energético (Bruce *et al.*, 2009). Neste sentido, a disfunção mitocondrial no fígado pode estar associada com o desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica em ratos obesos, devido à redução da beta oxidação de AG, à diminuição do citocromo C no fígado e da enzima carnitina palmitoil-CoA transferase-1 (Caldwell *et al.*, 1999; Sanyal, 2001; Rao e Reddy, 2004).

Como resultado da disfunção mitocondrial, o excesso de lipídeos no fígado pode promover a formação de espécies reativas de oxigênio, levando à peroxidação lipídica, inflamação e fibrose (Perez-Carreras *et al.*, 2003; Serviddio *et al.*, 2008). Adicionalmente, as repercussões da esteatose são sistêmicas, visto que a oxidação de AGs nas mitocôndrias dos hepatócitos provém de uma gama de substratos energéticos essenciais ao metabolismo e esta via metabólica encontra-se reduzida na esteatose (Flamment *et al.*, 2012).

1.1.2 Programação do tecido adiposo

Nos mamíferos existem dois tipos de tecido adiposo: o tecido adiposo marrom (TAM) e o tecido adiposo branco (TAB). O TAM do recém-nascido tem característica multilocular e é rico em mitocôndrias, sendo essencial para assegurar uma adaptação eficaz para o ambiente extrauterino. O desenvolvimento deste tecido e o seu crescimento durante a gestação é, em grande parte, dependente do suprimento de glicose da mãe para o feto via placenta (Power, 1989). A quantidade, localização

e tipo de tecido adiposo depositado podem também determinar a homeostase da glicose fetal. O tecido adiposo começa a surgir em meados da gestação e aumenta no término deste período, quando se observa uma mistura de adipócitos brancos e marrons (Bispham *et al.*, 2002).

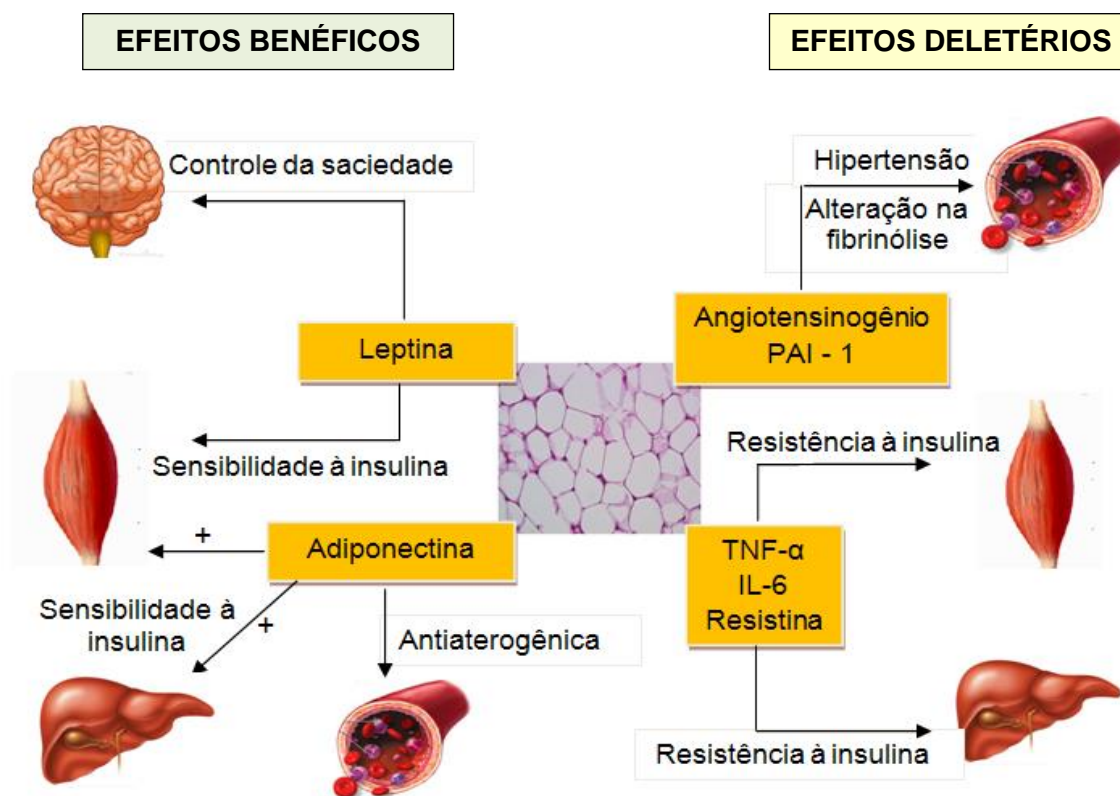
O TAM possui uma proteína de desacoplamento conhecida como UCP1 (uncoupling protein 1), um carreador de prótons mitocondrial, que é responsável pela produção rápida de grandes quantidades de calor no momento do nascimento (Symonds *et al.*, 2003). Em seguida, durante a vida pós-natal, a maioria dos depósitos de gordura marrom é substituído por tecido adiposo branco (TAB) (Symonds *et al.*, 2012a).

O desenvolvimento do tecido adiposo na prole pode ser modificado por mudanças na dieta materna durante a gravidez, especialmente com maior ingestão de dietas hipercalóricas, com alto teor de lipídeos saturados, provocando alterações adversas na prole, como por exemplo, diminuição da formação da TAM e aumento da TAB (Long *et al.*, 2012). A redução precoce na deposição de TAM pode perpetuar através do ciclo de vida, suprimindo o gasto energético, e, finalmente, promovendo a obesidade (Kozak *et al.*, 2012).

O TAB é um órgão constituído por vários tipos celulares (macrófagos, fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos) e caracterizado por um padrão unilocular. O TAB tem as funções de contribuir como barreira física ao trauma, armazenamento energético e secreção de proteínas bioativas com atuação local e à distância, denominadas adipocinas, sendo as mais descritas a adiponectina, leptina resistina, TNF-alfa, IL-6 e PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) (Prins, 2002; Fantuzzi, 2005).

Atualmente, sabe-se que o adipócito recebe a influência de diversos sinais, como a insulina, cortisol e catecolaminas, e, em resposta, libera uma grande variedade de adipocinas, participando da regulação de diversos processos como a função endotelial, aterogênese, sensibilidade à insulina e regulação do balanço energético através do controle da saciedade (Rasouli e Kern, 2008; Ouchi *et al.*, 2012) (Figura 2).

Figura 2 - Ações das adipocinas em órgãos distintos



Legenda: O tecido adiposo é conceituado como órgão endócrino, secretor de adipocinas, com atividade local e sistêmica (sistema nervoso central, músculo esquelético, fígado e vasos), que modulam a ingestão alimentar e o metabolismo energético, sobretudo de lipídeos e de carboidratos, configurando efeitos benéficos de citocinas, como leptina e adiponectina. Ademais, participam dos processos de inflamação, aterogênese, alterações na coagulação, culminando, inclusive no quadro de hipertensão arterial sistêmica, compondo os efeitos deletérios de algumas adipocinas. Legenda: PAI-1: *plasminogen activator inhibitor 1*; IL-6: interleucina-6; TNF- α : fator de necrose tumoral- α

Fonte: Ravussin e Smith, 2002; Skurk *et al.*, 2007.

O adipócito, de acordo com sua localização, pode apresentar características metabólicas diferentes, sendo a adiposidade intra-abdominal mais deletéria por apresentar maior impacto sobre a deterioração da sensibilidade à insulina (Van Harmelen *et al.*, 1998; Giorgino *et al.*, 2005).

Neste contexto, em 1956, Vague já chamava a atenção para a existência de padrões distintos de distribuição da adiposidade corporal; associando o padrão andróide (tido por deposição da gordura na porção superior do corpo) aos distúrbios metabólicos tais como hiperuricemia, dislipidemia e alterações do metabolismo glicêmico (Vague, 1956).

Desta forma, os compartimentos do tecido adiposo exibem diferentes respostas sistêmicas frente à expressão e secreção de adipocinas específicas. De modo geral, o tecido adiposo visceral, ou omental, é o mais ativo, ou seja, mais sensível à lipólise, via catecolaminas e beta-adrenorreceptores, porém mais resistente à ação da insulina, liberando maior concentração de ácidos graxos livres (AGL), diretamente na veia porta, favorecendo, inclusive o surgimento de doenças hepáticas, como a esteatose não alcoólica (Montague *et al.*, 1998; Arner, 2003).

Além disso, o tecido adiposo intra-abdominal, considerado visceral, secreta concentrações maiores de adipocinas ligadas a processos pró-inflamatórios como resistina, angiotensina I, resistina, TNF-alfa, IL-6, seguido do tecido adiposo subcutâneo abdominal e do tecido adiposo subcutâneo glúteo-femoral. Outras adipocinas como leptina e adiponectina são expressas majoritariamente no tecido subcutâneo tanto abdominal como glúteo-femoral, evidenciando seu caráter mais protetor (Kelley *et al.*, 2000; Wajchenberg, 2000).

Infere-se, portanto, nítida relação entre gordura visceral, resistência insulínica e risco cardiovascular, principalmente em proles geradas por mães que receberam dieta hiperlipídica, enfatizando a relevância da dieta materna para o futuro dos seus descendentes (Lerario *et al.*, 2002; Goodpaster *et al.*, 2005).

1.1.3 Programação e diferenças sexuais

Conceitua-se dimorfismo sexual como a diferença entre machos e fêmeas de uma mesma espécie quanto aos parâmetros anatômicos, fisiológicos ou comportamentais. O fato de estas diferenças variarem entre as espécies de um modo mensurável e constante sugere que o fenômeno tem uma base biológica (Plavcan, 2011; Junien *et al.*, 2012).

Neste contexto, existem diferenças no crescimento fetal, morbidade e mortalidade fetal e neonatal, que são diretamente relacionadas ao gênero do indivíduo (Di Renzo *et al.*, 2007). Hipóteses tentam elucidar como as diferenças sexuais poderiam interferir no desenvolvimento do indivíduo, basicamente apoiadas pelo advento dos estudos epigenéticos (Stevenson *et al.*, 2000).

O termo epigenética representa a programação do genoma para expressar o conjunto apropriado de genes em células específicas em momentos específicos da vida. Inclui mudanças hereditárias na atividade e expressão do gene, mas também alterações estáveis em longo prazo no potencial de transcrição de uma célula que não é necessariamente hereditária. Essas mudanças podem ser produzidas em especial pelo ambiente no início da vida, particularmente intrauterino e pode afetar a saúde na vida adulta, influenciando a susceptibilidade a diversas doenças (Szyf, 2009).

Desta forma, os cromossomos sexuais determinam, de forma central, as características sexuais do indivíduo, estando envolvidos também na expressão de genes relacionados a diversas funções fisiológicas (Fish, 2008). Em fêmeas, um cromossomo X pode ser aleatoriamente inativado em períodos precoces da embriogênese, mediado por metilação dos resíduos de cistina em ilhas CpG. Entretanto, em condições intrauterinas adversas, esta inativação pode tornar-se seletiva e não aleatória no cromossomo X relacionado a doenças futuras, configurando com isto, vantagens e proteção para o gênero feminino em detrimento ao masculino (Zeng e Yankowitz, 2003; Reik e Lewis, 2005).

Machos têm estratégias que permitem manter elevada a velocidade de crescimento fetal mesmo em ambientes adversos, o que pode comprometer o desenvolvimento de órgãos vitais, uma vez que o aporte energético e de nutrientes

maternos são majoritariamente desviados para a formação óssea e corporal. Enquanto o gênero feminino se adapta ao meio no qual está inserido, diminuindo a velocidade de crescimento, porém mantendo os padrões de normalidade, propiciando o desenvolvimento satisfatório de órgãos e sistemas como um todo (Clifton, 2010). Múltiplas alterações genéticas nas placentas de fetos femininos vêm sendo sugeridas, indicando novamente uma adaptação mais eficiente deste gênero em situações contrárias e conflitantes, como excesso de nutrientes, devido a uma dieta materna hiperlipídica (Sood *et al.*, 2006; Gallou-Kabani *et al.*, 2010).

Com isto, uma programação desfavorável poderia ocasionar vários defeitos e susceptibilidade a doenças diferentemente entre machos e fêmeas. A programação epigenética poderia ser transmitida a gerações subsequentes de uma forma específica para cada gênero e ocasionar efeitos transgeracionais, com o desenvolvimento de entidades nosológicas, tais como obesidade, resistência insulínica e inflamação, mais expressos em indivíduos masculinos (Gabory *et al.*, 2009; Grove *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Estudar se a obesidade materna pode influenciar o fígado, a morfologia dos adipócitos, o perfil metabólico e secretor do tecido adiposo na prole de camundongos machos e fêmeas.

2.2 Específicos

- a) Acompanhar a evolução da massa corporal e a ingestão alimentar das proles de machos e fêmeas durante os três meses de vida.
- b) Verificar o comportamento glicêmico e do metabolismo lipídico das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.
- c) Estudar a estrutura hepática das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.
- d) Avaliar o padrão de distribuição e morfologia dos tecidos adiposos das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.
- e) Verificar a expressão de adipocinas no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.
- f) Verificar se existem diferenças entre gêneros para as variáveis estudadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e dieta

Todos os procedimentos experimentais realizados seguiram as normas estabelecidas no guia convencional para a experimentação com animais (Publicação NIH Nº. 85-23, revisado em 1996). O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (protocolo nº CEA/052/2010).

Camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6 foram alocados no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e doença Cardiovascular (LMMC), em caixas de polipropileno, mantidos em condições controladas de temperatura ($21\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade ($60\pm 10\%$), com livre acesso à comida e à água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12h claro-escuro e de renovação de ar (15 minutos/h).

A escolha da linhagem de animais C57BL/6 foi devido à sua predisposição ao desenvolvimento de obesidade e alteração do metabolismo da glicose quando alimentada com dieta hiperlipídica (Schreyer *et al.*, 1998).

A partir de quatro semanas de idade, fêmeas virgens C57BL/6 foram separadas aleatoriamente em grupo **SC** (*Standard Chow*, com 17% da energia advinda do lipídeo) ou grupo **HF** (*High-fat*, com 49% da energia proveniente do lipídeo). Os animais do grupo **SC** (n=10) receberam dieta própria para roedores para a fase de gestação/lactação; normoproteica (19g proteína/Kg dieta) e normolipídica (17g lipídeos/Kg dieta). O grupo **HF** (n=10) recebeu dieta contendo alto teor de lipídeos (49g lipídeos/Kg dieta) e com o mesmo percentual de proteínas (19%) da dieta SC. Ressalta-se que o incremento do percentual lipídico da dieta HF foi compensado pela redução de hidratos de carbono. O aporte de vitaminas e minerais foi idêntico nas duas dietas, seguindo as normas preconizadas para roedores do “American Institute of Nutrition” (Reeves *et al.*, 1993). As dietas experimentais foram confeccionadas pela empresa Pragsoluções (Jau, SP, Brasi). A composição nutricional está mostrada na Tabela 1.

A rotina dietética foi mantida por oito semanas pré-gestacionais, continuando-se durante gestação e lactação, perfazendo um total de 14 semanas. A massa corporal e ingestão alimentar das mães foram avaliadas durante todo o período. Análise das concentrações maternas de glicose foi feita dois dias anteriores ao acasalamento, após as oito semanas de dietas experimentais.

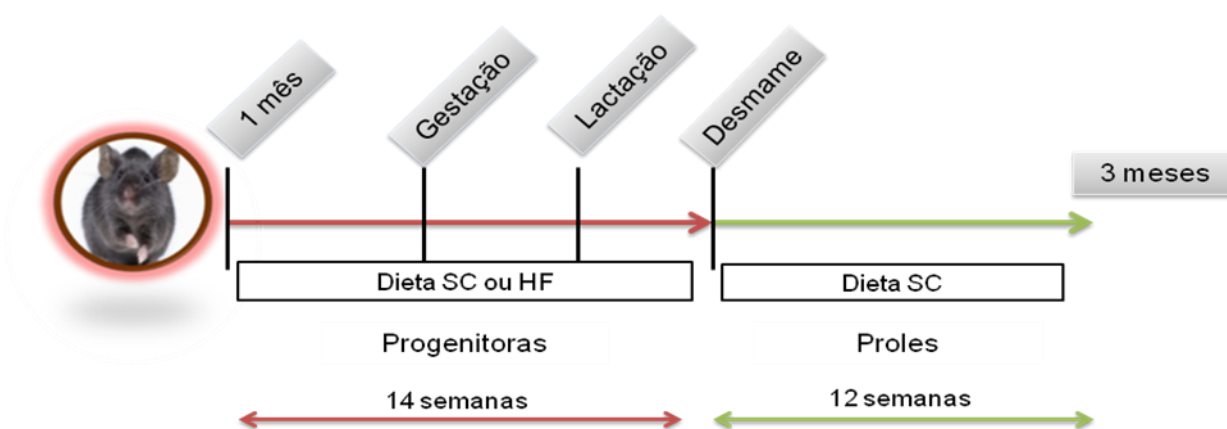
Tabela 1 - Composição das dietas experimentais

Nutrientes	Dietas experimentais	
	HF	SC
Caseína	230,0	190,0
Maisena	299,486	539,486
Sacarose	100,0	100,0
Óleo de soja	70,0	70,0
Banha de porco	200,0	-
Fibra	50,0	50,0
Mistura de vitaminas*	10,0	10,0
Mistura de minerais**	35,0	35,0
Cistina	3,0	3,0
Colina	2,5	2,5
Antioxidante	0,014	0,014
Total em gramas	1.000,0	1.000,0
Energia (Kcal/Kg)	4.950,0	3.950,0
Hidratos de carbono (%)	32	64
Proteínas (%)	19	19
Lipídeos (%)	49	17

Legenda: Mistura de vitaminas* e de minerais** segundo a recomendação da AIN-93G
 Fonte: Reeves *et al.*, 1993.

O acasalamento dos animais ocorreu quando as fêmeas SC e HF completaram 12 semanas de idade, avaliando-se o *plug* vaginal para confirmação da gravidez. Ao nascimento, o gênero dos filhotes foi identificado a partir da distância ano-genital. A seguir, os filhotes foram pesados separadamente. Posteriormente, o tamanho da ninhada foi ajustado para seis animais (três machos e três fêmeas, quando possível) por lactante, a fim de garantir nutrição adequada (Langley-Evans *et al.*, 1996). Ao desmame (21 dias de idade) as proles de machos e fêmeas foram denominadas de acordo com a dieta materna: SC machos e SC fêmeas - derivados das mães alimentadas com dieta padrão; e HF machos e HF fêmeas - derivados das mães alimentadas com dieta hiperlipídica. Todos os filhotes receberam dieta padrão (SC) AIN-93G até os três meses de idade. Nesta idade um filhote por ninhada das mães SC e HF foi sacrificado aleatoriamente (Figura 3).

Figura 3 – Desenho experimental



Legenda: Desenho experimental demonstrando que as progenitoras do estudo receberam dieta padrão (SC) ou *high fat* (HF) a partir de um mês de vida até o final da lactação, perfazendo um total de 14 semanas de dietas experimentais. Enquanto as proles geradas receberam após o desmame somente dieta padrão para roedores (SC, AIN 93G) até o terceiro mês de vida, quando foram sacrificadas.

3.2 Massa corporal, ingestão alimentar e energética

Desde o nascimento até os três meses de idade, a massa corporal dos animais foi mensurada semanalmente por meio de balança digital de precisão. A ingestão

alimentar foi monitorada diariamente (sempre no mesmo horário, às 12h), mediante subtração entre a quantidade total de ração e a quantidade remanescente na caixa. As dietas experimentais eram renovadas diariamente descartando a ração não ingerida. A ingestão energética diária foi obtida multiplicando-se a gramatura de ração ingerida pelo valor calórico da dieta em quilocalorias.

3.3 Glicemia de jejum e teste oral de tolerância a glicose (TOTG)

TOTG foi realizado dois dias anteriores ao acasalamento das progenitoras, e nos filhotes, ao completarem três meses de idade. Para tal, os animais ficaram em jejum durante 6 horas e depois foi administrada, por gavagem orogástrica, uma solução contendo glicose (25% em salina estéril- 0,9% NaCl) na dosagem de 1g/kg. Posteriormente, o sangue da veia caudal foi coletado após os tempos 0, 15, 30, 60 e 120 minutos, sendo a determinação dos níveis de glicose sanguínea (em mg/dL) obtida com o glicosímetro (Accu-Chek, Roche, SP, Brazil). Os valores de glicose no tempo 0 foram considerados como valores de glicemia de jejum e para a avaliação da intolerância à glicose foi considerada a área sob a curva (ASC), mensurada a partir da utilização do software Prisma (versão 5.03 para Windows, software GraphPad, San Diego, CA, USA).

3.4 Eutanásia

Aos três meses de idade, fez-se a eutanásia dos filhotes, os quais foram mantidos em jejum de seis horas. No momento da eutanásia os animais receberam heparina (200mg/kg) e foram profundamente anestesiados com injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (150 mg/kg), em seguida o tórax foi aberto expondo o coração e amostras de sangue foram obtidas rapidamente por punção cardíaca (átrio direito).

O fígado e os depósitos de gordura genital (epididimária nos machos; ovariana nas fêmeas), inguinal e perirenal foram removidos. A gordura intra-abdominal presente na porção inferior do abdômen, conectada aos ovários e tubas uterinas (em fêmeas) e epidídimos (em machos) foi considerada gordura genital ovariana e

epididimária, respectivamente. O tecido adiposo subcutâneo entre a parte inferior da caixa torácica e a coxa foi considerado como gordura inguinal, enquanto a gordura conectada à parede abdominal posterior na vizinhança dos rins e à porção abdominal dos ureteres foi tida como perirenal.

Após a dissecação e separação dos tecidos, o fígado teve seu volume obtido por deslocamento líquido (princípio de Arquimedes) e os depósitos de gordura foram pesados individualmente em balança de precisão.

A razão entre as gorduras genital/inguinal foi analisada. O índice de adiposidade das proles foi calculado pela divisão da soma das massas das gorduras (genital, inguinal e perirenal) pela massa corporal total (apresentado em %) (Neyrinck *et al.*, 2009).

3.5 Análises plasmáticas

No momento da eutanásia dos animais, foi retirada amostra sanguínea do átrio direito através de punção cardíaca. Imediatamente após a retirada de sangue, o plasma foi separado por centrifugação (120g por 15 minutos) em temperatura ambiente e estocado à temperatura de -80°C até a realização da análise bioquímica.

As concentrações plasmáticas de colesterol total e triglicérides (TG) foram quantificadas por método enzimático colorimétrico usando um espectrofotômetro automático e kits comerciais conforme as instruções preconizadas (Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

As concentrações plasmáticas de leptina, insulina e adiponectina foram mensuradas por imunabsorbância pelo método ELISA utilizando kit Milliplex (mouse serum adipokine panel MADPK-71K-07 para insulina e leptina; MADPK-71K-1ADPN para adiponectina). Todas as análises foram realizadas em equipamento Luminex xMAP, tendo como resultado final um ensaio “sanduíche” através de microesferas.

3.6 Fígado: triglicérides e esteatose

Uma parte do fígado foi congelada a -80°C para posterior análise dos TG hepáticos. Outra parte foi dividida em fragmentos, contemplando todos os lobos do fígado, fixados para microscopia de luz (1,27mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2), permanecendo no fixador durante 48 horas em temperatura ambiente. TG foram quantificados pelo método enzimático colorimétrico utilizando espectrofotômetro automático (Bioclin System II, Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil) e o seu respectivo kit para análise (Quibasa Ltda, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Os fragmentos hepáticos foram desidratados em concentrações crescentes de alcoóis, diafanizados em xilol e incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA). O material foi seccionado com 5 μm de espessura e os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

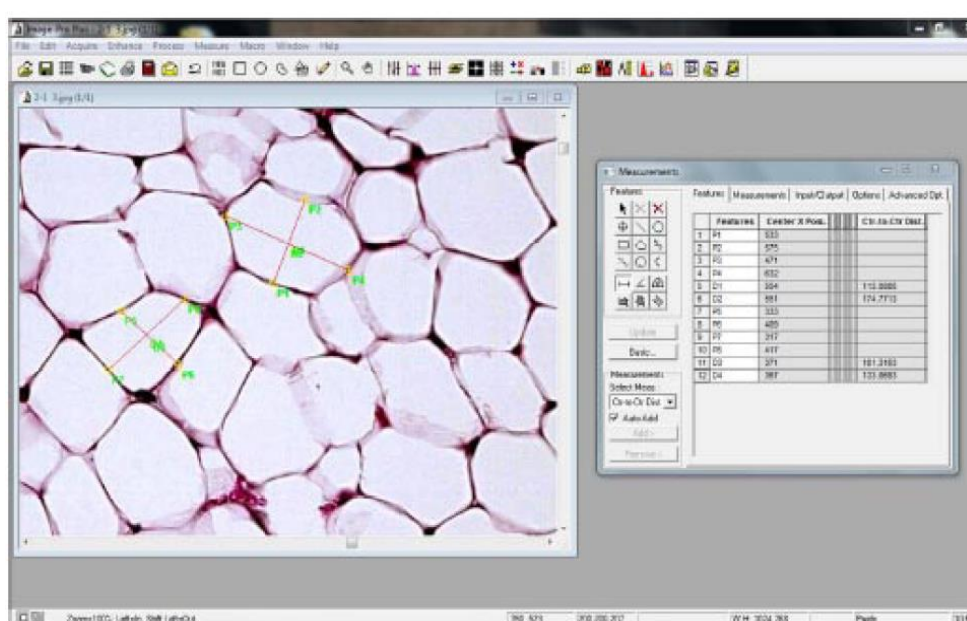
Para a determinação da quantidade de esteatose hepática utilizou-se a análise estereológica com um sistema de vídeo-microscopia. As imagens digitais foram obtidas com um microscópio Leica DMRBE (Leica *Microsystems* GmbH, Wetzlar, Alemanha) e uma câmera *Infinity* 1-5C (Lumenera Co., Ottawa, ON, Canadá). Um sistema-teste com 36 pontos, produzido com STEPanizer (www.stepanizer.com) (Tschanz *et al.*, 2011) foi usado para a aquisição de dados. A densidade de volume da esteatose hepática (V_v) foi estimada através da razão entre os pontos parciais que tocam as gotículas de gordura (P_p) em relação aos pontos totais (P_T): [$V_v = P_p/P_T$ (%)] (Souza-Mello *et al.*, 2007). Para tal quantificação considerou-se seis campos aleatórios por animal.

3.7 Morfometria de adipócitos

Os aglomerados adiposos dos animais foram fixados durante 48 horas em 1,27mol/L de formaldeído em 0,1M de tampão fosfato, pH 7,2, incluídos em Paraplast plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, USA), seccionados com 5 μm de espessura e as lâminas foram coradas com HE. Imagens digitais foram obtidas com o mesmo equipamento já descrito (microscópio Leica DMRBE, Leica *Microsystems*

GmbH, Wetzlar, Alemanha, e câmera *Infinity 1-5C*, Lumenera Co., Ottawa, ON, Canadá). Os adipócitos foram amostrados representando os três compartimentos de gordura dissecados e sua morfometria foi realizada. Os diâmetros menor e maior de pelo menos 50 adipócitos por animal foram mensurados para estimar o diâmetro médio (Image-Pro Plus versão 7.01, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Área seccional média dos adipócitos obtida pelo software Image-Pro Plus



Legenda: Duas medidas de diâmetro por célula adiposa (representadas pelas retas vermelhas) perfazem o cálculo do diâmetro médio do adipócito de cada animal estudado.

3.8 Expressão de adipocinas no tecido adiposo genital

As expressões das proteínas TNF-alfa, Interleucina-6, Adiponectina e Leptina foram determinadas no tecido adiposo genital utilizando a técnica de Western Blotting. As proteínas totais a partir do tecido adiposo genital foram extraídas com auxílio de tampão de lise e de inibidores de protease. Posteriormente, o homogenato obtido foi centrifugado duas vezes durante 10 minutos a 4° C, e o sobrenadante foi

coletado. Em seguida a concentração de proteína foi determinada usando o ensaio de proteína BCA kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Após desnaturação, as proteínas foram separadas por electroforese em um gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EUA). As membranas foram bloqueadas com leite desnatado (diluição de 5% em solução tampão de *tris* com *tween*: T-TBS) e incubadas com anticorpo policlonal *anti-goat* TNF-alfa (26 kDa; Santa Cruz Biotechnology, INC, SC-1350), anticorpo policlonal *anti-mouse* Interleucina-6 (26 kDa; Millipore, Billerica, MA, EUA, JBC-1.794.833), anticorpo policlonal *anti-rabbit* Adiponectina (30 kDa; Sigma, St. Louis, Missouri, EUA, A6354) e anticorpo policlonal *anti-rabbit* Leptina (16 kDa; Sigma-Aldrich Co., St.Louis, Missouri, EUA, L3410), lavadas e incubadas com anticorpos secundários específicos.

As expressões das proteínas supracitadas foram detectadas através de um sistema detector de quimioluminescência (ECL-Amersham). Os sinais foram visualizados por autorradiografia e determinados através de análises quantitativas de imagens digitais dos géis. Para tal, utilizou-se o software Imaje J, versão 1.46 (Media Cybernetics, Silver Spring, MD, USA) para calcular os valores da densidade integral óptica das proteínas descritas. Finalmente, fez-se a correção das bandas através da expressão de uma proteína estrutural, β -actina (45 kDa; Santa Cruz Biotechnology, INC, SC-81178).

3.9 Análise estatística

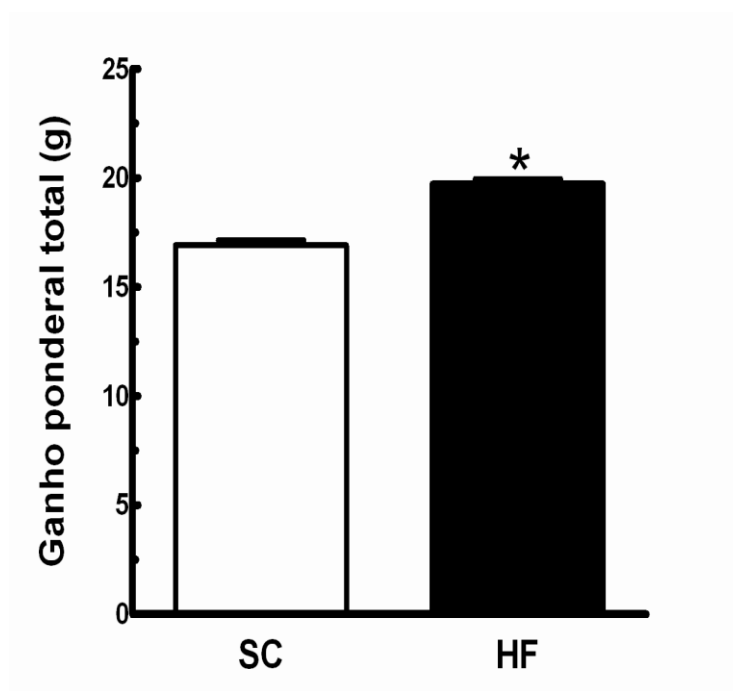
Todos os dados foram testados para a curva de distribuição normal e homogeneidade de variância, sendo expressos como média e erro padrão da média (EPM). As diferenças entre os grupos foram analisadas usando um dos seguintes testes: Teste T não pareado (para testar dados entre progenitoras **SC** e **HF** e pares de grupos nas proles); *one-way* ANOVA seguida de pós-teste de *Tukey* (para estudar as proles) ou *two-way* ANOVA, para determinar o efeito da dieta materna e gênero nas variáveis estudadas (*GraphPad Prism* versão 5.03 GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de $P \leq 0,05$ (Zar, 1999).

4 RESULTADOS

4.1 Dados maternos

As progenitoras toleraram bem a dieta oferecida. Mães alimentadas com dieta **HF** ao longo de oito semanas pré-gestacionais e durante a gravidez e lactação apresentaram aumento significativo no ganho ponderal total durante todo o experimento (+20%, $P < 0,001$; Figura 5). Valores referentes à massa corporal inicial e final das progenitoras SC e HF estão mostrados na Tabela 2.

Figura 5 - Ganho ponderal total das progenitoras dos grupos SC e HF durante todo o período experimental



Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças foram testadas com teste T não pareado. Símbolo [*] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** ($P < 0,001$). Grupos: **SC**=grupo controle, **HF**= grupo *high fat*.

A ingestão alimentar das mães HF e SC não foi diferente durante o período estudado. No entanto, a ingestão energética foi maior nas mães HF (+20%, $P<0,05$; Tabela 2). As mães HF ao final do período pré-gestacional demonstraram aumento da glicemia de jejum (+22%, $P<0,01$) e intolerância à glicose, achado que foi corroborado pelo maior valor da área sob a curva em relação ao grupo SC (+32%, $P<0,001$), conforme mostra a Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros biométricos e bioquímicos das mães SC e HF

Parâmetros	Progenitoras	
	SC	HF
Massa corporal inicial, g	9,57±0,20	9,56±0,50
Massa corporal final, g	26,5±0,4	29,9±0,5**
Ingestão alimentar, g/dia/animal	2,3±0,1	2,2±0,1
Ingestão energética, kcal/dia/animal	9,09±0,30	10,89±0,30*
Glicose sanguínea, mmol/L	4,69±0,20	5,72±0,20**
TOTG, ASC, u.a.	13,3±0,2	17,5±0,6***

Legenda: Os dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças foram testadas com teste T não pareado. Nível de significância adotado: $P<0,05$ sendo: [*] $P<0,05$, [**] $P<0,01$ e [***] $P<0,001$ quando comparado com **SC**. Grupos: **SC**=grupo controle, **HF**= grupo *high fat*.
Legenda: TOTG (teste oral de tolerância à glicose), ASC (área sob a curva).

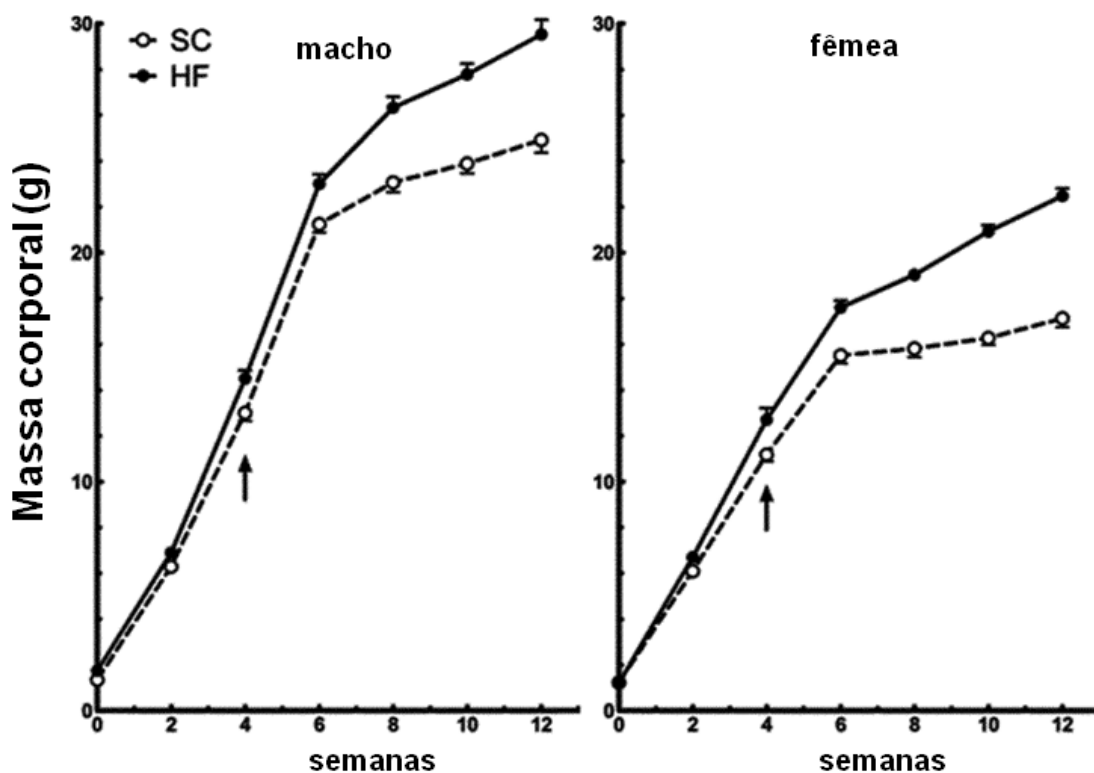
4.2 Dados das proles

4.2.1 Massa corporal, ingestão alimentar e energética

Proles provenientes de mães **HF** apresentaram maior ganho ponderal, quando comparados aos filhotes de mães **SC**. A dieta **HF** materna, não exerceu efeitos sobre a massa corporal dos filhotes dos gêneros masculino e feminino no momento do nascimento (Tabela 3). No entanto, foram observadas diferenças significativas na massa corporal a partir da quarta semana de idade na prole de machos (+9%, $P < 0,01$) e de fêmeas (+9%; $P < 0,01$) (Figura 6). Houve dimorfismo sexual a partir da sexta semana de vida dos animais, sendo os machos mais pesados que as fêmeas, tanto na prole **SC** quanto na prole **HF** ($P < 0,001$).

Na 12^a semana de vida, a massa corporal estava 20% maior no grupo **HF** macho e 30% maior no grupo **HF** fêmea do que seus respectivos grupos **SC** macho e **SC** fêmea ($P < 0,0001$ para ambos os gêneros). A dieta materna e o gênero afetaram significativamente a evolução da massa corporal nas proles ($P < 0,0001$, *two-way* ANOVA), entretanto, não houve interação entre a dieta materna e o gênero ($P > 0,05$, *two-way* ANOVA).

Figura 6 - Evolução da massa corporal das proles de machos e fêmeas



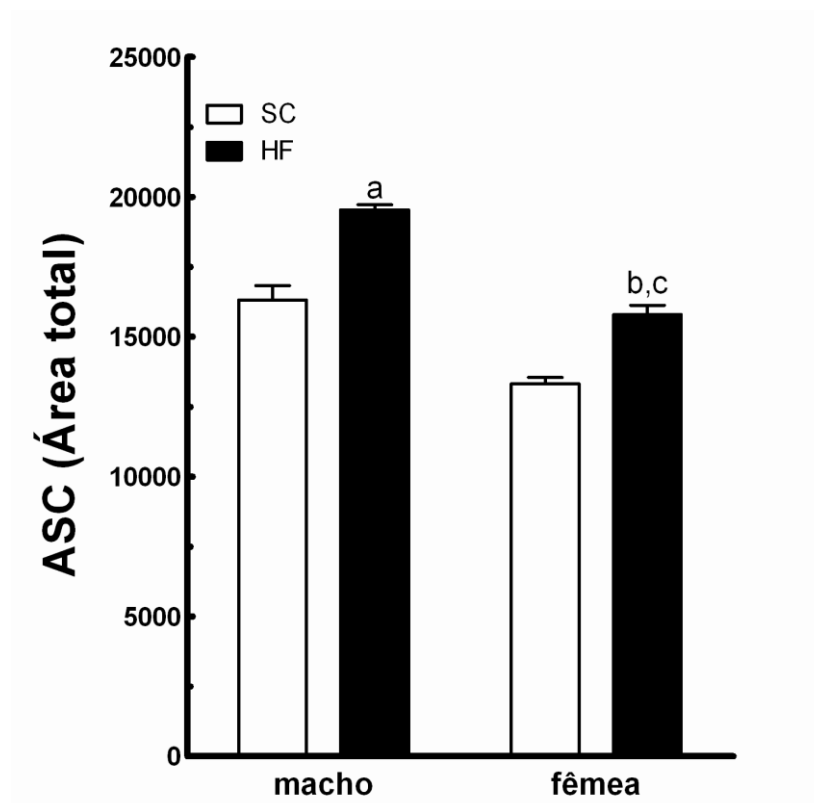
Legenda: Evolução da massa corporal (em gramas) dos filhotes machos (à esquerda) e fêmeas (à direita), do nascimento até 12 semanas de idade. Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças foram testadas com teste T não pareado. As setas indicam o período onde começaram as diferenças estatísticas nas massas corporais entre os grupos e a partir deste ponto perduraram até o final do experimento ($P < 0,01$).

Proles das mães HF apresentaram maior ingestão alimentar do que o respectivo grupo controle, em ambos os gêneros (+20%, $P < 0,001$), o que refletiu em maior consumo energético nestes grupos (o mesmo percentual, como descrito anteriormente). Os filhotes machos SC e HF apresentaram maiores valores para ingestão alimentar e energética do que as fêmeas SC e HF ($P < 0,01$), como descrito na Tabela 3. A dieta materna e o gênero das proles influenciaram a ingestão energética ($P < 0,0001$, *two-way* ANOVA), assim como a dieta materna interagiu significativamente com o gênero ($P = 0,02$, *two-way* ANOVA).

4.2.2 Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG)

Aos três meses de idade houve intolerância à glicose nos filhotes **HF** machos e fêmeas em comparação com os respectivos grupos **SC**, evidenciada por aumento da área sob a curva nestes grupos (20%, $P < 0,05$ em ambos os gêneros). Este incremento foi maior nos machos **HF** do que nas fêmeas **HF** (+23%, $P < 0,01$). A dieta materna e o gênero afetaram significativamente a intolerância à glicose ($P < 0,0001$, *two-way* ANOVA), mas não houve interação entre a dieta materna e gênero para esta variável ($P > 0,05$, *two-way* ANOVA).

Figura 7 - Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose das proles de machos e fêmeas



Legenda: Área sob a curva do teste oral de tolerância à glicose das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade. Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P < 0,05$); símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P < 0,05$) e símbolo [c] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **HF** macho ($P < 0,01$), dimorfismo sexual.

4.2.3 Análises plasmáticas

A obesidade materna induziu alterações no perfil lipídico e nos níveis plasmáticos das adipocinas na prole adulta (Tabela 3). Aumento do colesterol total foi detectado nos grupos **HF** macho (+35%, $P < 0,01$) e **HF** fêmea (+25%, $P < 0,05$), sendo os níveis plasmáticos de colesterol mais pronunciados no gênero masculino do que no gênero oposto (+25% em SC, +32% em HF; $P < 0,01$). Hipertrigliceridemia foi encontrada apenas no grupo HF macho (+21%, $P < 0,05$) quando comparado ao respectivo grupo **SC**, sem diferença entre machos e fêmeas, mostrando importante dimorfismo sexual neste parâmetro. A dieta materna e o gênero influenciaram independentemente os níveis de colesterol total ($P < 0,0001$, *two-way ANOVA*), porém sem interação entre a dieta materna e o gênero ($P > 0,05$, *two-way ANOVA*). A dieta materna só influenciou os TG plasmáticos ($P < 0,0001$, *two-way ANOVA*).

Quanto às adipocinas plasmáticas, houve hiperleptinemia (+50%, $P < 0,01$) e concomitante diminuição da adiponectina (-37%, $P < 0,05$) no grupo **HF** macho em relação ao grupo **SC** macho. A dieta materna e o gênero afetaram significativamente a leptina e adiponectina plasmáticas ($P < 0,001$, *two-way ANOVA*). Houve interação entre a dieta materna e o gênero para leptina ($P = 0,0002$, *two-way ANOVA*), porém não houve interação para adiponectina plasmática ($P > 0,05$, *two-way ANOVA*).

Hiperinsulinemia foi observada apenas no grupo **HF** macho (+150%, $P < 0,01$), sem alterações no grupo **HF** fêmea, indicando notória diferença sexual, na qual as fêmeas **HF** parecem ter sido preservadas (Tabela 3). A dieta materna e o gênero influenciaram significativamente os níveis de insulina ($P < 0,0001$, *two-way ANOVA*). Adicionalmente, houve interação entre a dieta materna e o gênero para a variável em questão ($P < 0,0001$, *two-way ANOVA*).

Tabela 3 - Parâmetros avaliados nas proles submetidas a diferentes rotinas dietéticas

Parâmetros	Proles			
	SC macho	SC fêmea	HF macho	HF fêmea
MC ao nascimento, g	1,34 ± 0,03	1,23 ± 0,02	1,43 ± 0,02	1,22 ± 0,02
Ingestão alimentar, g/dia/animal	2,4 ± 0,03	1,95 ± 0,02 ^a	2,88 ± 0,06 ^a	2,32 ± 0,04 ^{b,c}
Ingestão energética, kcal/dia/animal	9,48 ± 0,2	7,7 ± 0,3 ^a	11,38 ± 0,4 ^a	9,16 ± 0,4 ^{b,c}
CT, mg/dl	61,3 ± 3,23	49,17 ± 2,09 ^a	82,20 ± 4,55 ^a	62,17 ± 3,28 ^{b,c}
TG, mg/dl	52,86 ± 0,86	59,83 ± 1,35	64,50 ± 1,77 ^a	59,00 ± 2,67
Leptina, pg/ml	278,14 ± 20,09	283,14 ± 24,83	417,69 ± 8,78 ^a	351,13 ± 3,10
Insulina, pg/ml	117,73 ± 18,13	98,19 ± 5,90	290,63 ± 9,07 ^a	189,37 ± 17,38
Adiponectina, 10 ⁶ pg/ml	6,94 ± 0,63	10,04 ± 0,98	4,90 ± 0,63 ^a	5,75 ± 1,12
Massa hepática, g/cm	0,34 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,50 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,02 ^b
Índice de adiposidade, %	2,6 ± 0,1	3,2 ± 0,1 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	3,7 ± 0,1 ^{b,c}

Legenda: Os dados foram expressos em média ± EPM. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolos representam diferença significativa ($P < 0,05$) comparada com o grupo **SC** macho [a], **SC** fêmea [b], **HF** macho, dimorfismo sexual [c]. CT (colesterol total), MC (massa corporal), TG (triglicérides).

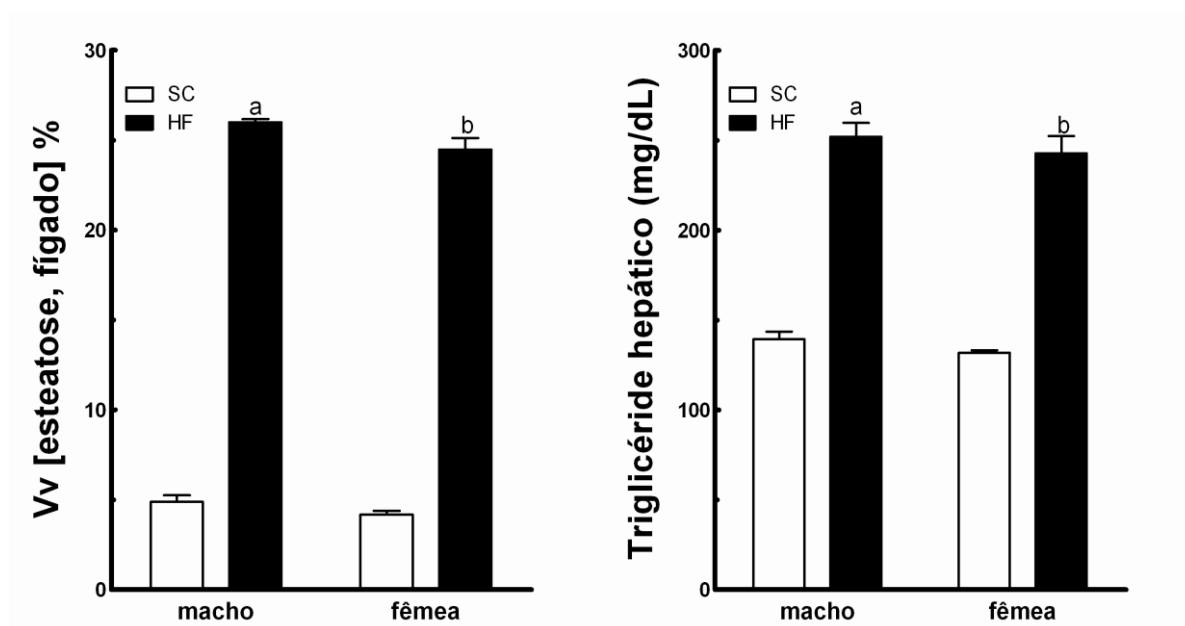
4.2.4 Fígado

Houve aumento do fígado (hepatomegalia) nas proles geradas por mães obesas (machos +45%, $P < 0,001$; fêmeas +35%, $P < 0,001$) (Tabela 3).

A presença de esteatose hepática foi confirmada através da quantificação estereológica do fígado. As proles **SC**, machos e fêmeas, apresentaram estrutura hepática preservada, com pouca quantidade de esteatose (inferior a 5%, percentual considerado normal). Entretanto, como esperado, os grupos **HF** macho (27%) e **HF** fêmea (25%), evidenciaram maior percentual de esteatose em comparação às respectivas proles SC ($P < 0,0001$, em ambos os gêneros). Corroborando com estes resultados, houve também aumento acentuado do TG hepático nos grupos **HF** macho (+81%; $P < 0,0001$) e **HF** fêmea (+84%; $P < 0,0001$) em relação aos grupos **SC**, como demonstrado na Figura 8. A dieta materna influenciou o percentual de esteatose e TG hepático ($P < 0,0001$, *two-way* ANOVA). O gênero afetou somente o percentual de esteatose ($P = 0,003$ *two-way* ANOVA), porém não houve interação entre a dieta materna e o gênero para esteatose hepática e conteúdo de TG no fígado ($P > 0,05$, *two-way* ANOVA).

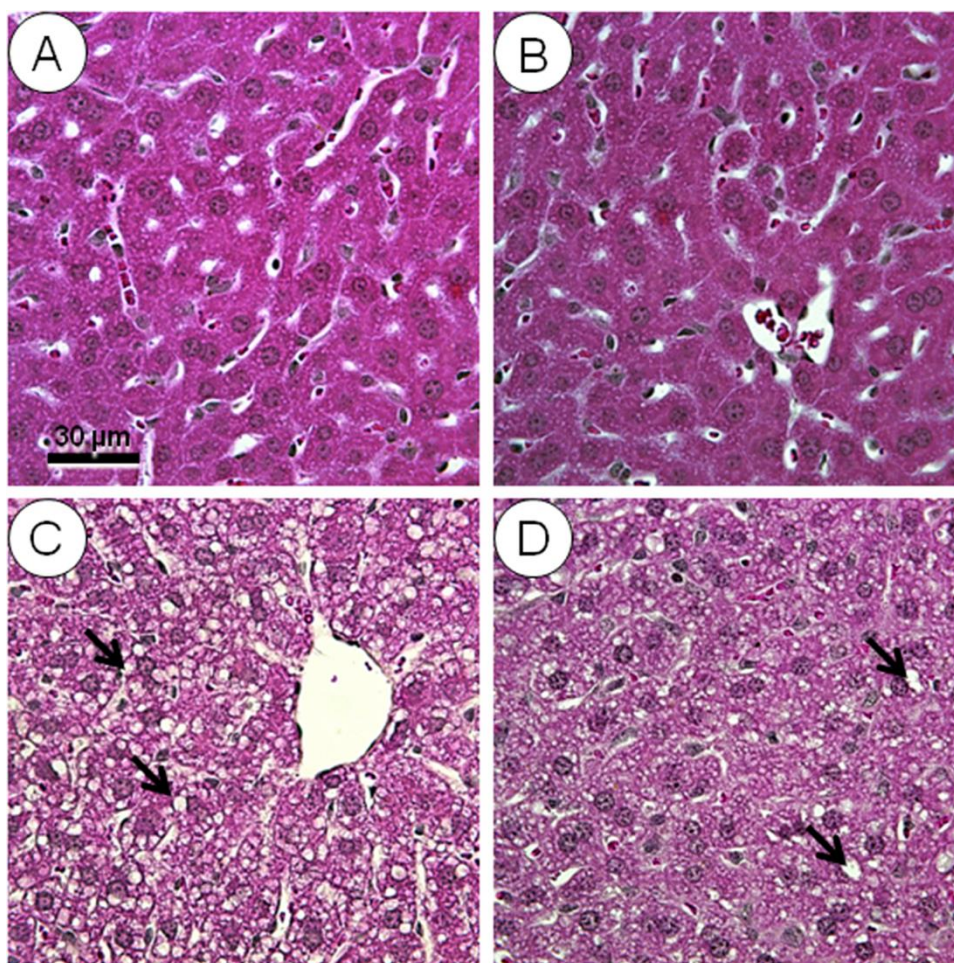
A análise das imagens realizadas pela microscopia de luz permitiu observar macro e microesteatose em grande quantidade nos filhotes **HF**, machos e fêmeas, em comparação aos respectivos grupos **SC** (Figura 9). Não houve diferenças entre gêneros para os parâmetros supracitados.

Figura 8 - Densidade de volume de esteatose (%) e triglicéride hepático das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P < 0,0001$), símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P < 0,0001$).

Figura 9 - Fotomicrografias do fígado das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



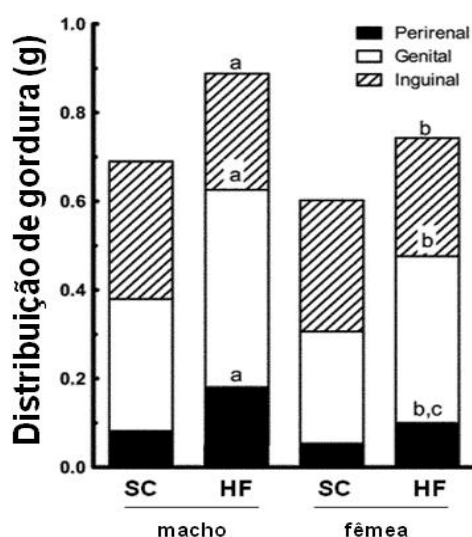
Legenda: Coloração HE. Mesmo aumento. A – Animais do grupo **SC** macho apresentando hepatócitos de aspecto normal, sem presença de esteatose. B – Animais do grupo **SC** fêmea apresentando hepatócitos de aspecto normal, sem presença de esteatose. C – Animais do grupo **HF** macho apresentando hepatócitos com presença de macro e micro gotículas de gordura em grande quantidade (setas). D – Animais do grupo **HF** fêmea apresentando hepatócitos com inúmeras gotículas (macro e micro) de gordura (setas).

4.2.5 Depósitos de gordura

A obesidade materna induzida por dieta hiperlipídica influenciou negativamente a distribuição do tecido adiposo da prole adulta, aos três meses de idade (Figura 10). O depósito de gordura perirenal demonstrou-se aumentado em proles de mães obesas, tanto no grupo **HF** macho (+100%, $P<0,001$) quanto no grupo **HF** fêmea (+85%, $P<0,001$) em comparação aos seus respectivos grupos **SC**. No entanto, os machos **HF** apresentaram maior acúmulo neste compartimento ($P<0,001$).

No que tange à gordura genital, os grupos **HF** macho e **HF** fêmea tiveram maior acúmulo deste depósito (+50%, $P<0,05$ em ambos os gêneros) do que seus respectivos grupos **SC**. Entretanto, houve diminuição do compartimento de tecido adiposo inguinal nos grupos **HF** macho (-15%, $P<0,05$) e **HF** fêmea (-10%, $P<0,05$) em relação aos grupos **SC**.

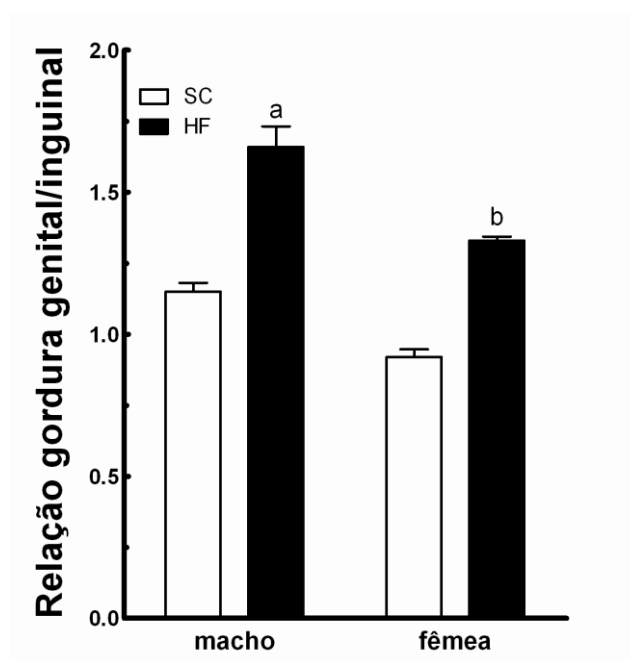
Figura 10 - Distribuição dos compartimentos de gordura corporal das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P<0,05$), símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P<0,05$) e símbolo [c] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **HF** macho ($P<0,001$), dimorfismo sexual.

A relação entre as gorduras genital/inguinal indicou o padrão de distribuição de gordura em cada grupo, demonstrando um aumento de 45% nos grupos **HF** macho e **HF** fêmea quando comparados aos grupos **SC** ($P<0,05$; Figura 11).

Figura 11 - Relação entre os compartimentos de gordura genital e inguinal nas proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P<0,05$) e símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P<0,05$).

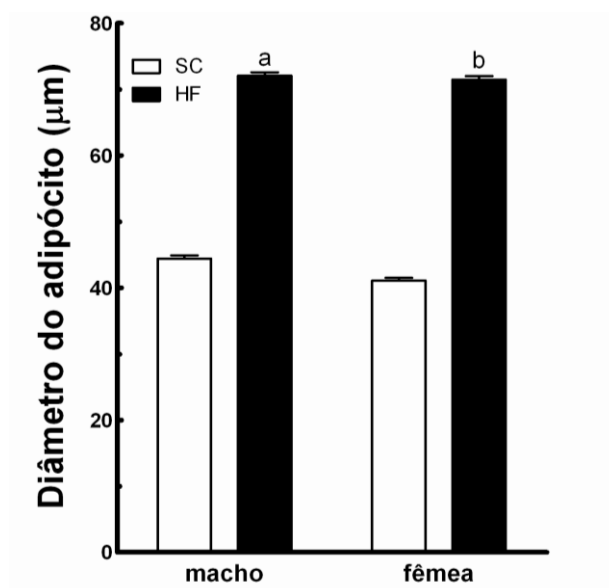
O índice de adiposidade foi mais pronunciado nos filhotes **HF**, tendo um aumento de 20% em ambos os gêneros com relação aos grupos **SC** ($P<0,05$). Todavia quando foram comparados machos e fêmeas do mesmo grupo, o gênero feminino obteve esse índice mais expressivo do que no gênero masculino (+23% em **SC**; $P<0,01$ e +16% em **HF**; $P<0,05$), indicando que as fêmeas têm maior percentual de gordura total, em relação à sua massa corporal (Tabela 3). A dieta materna e o gênero afetaram independentemente estes parâmetros ($P<0,0001$, *two-way*

ANOVA), havendo também interação entre a dieta materna e o gênero para a adiposidade nas proles ($P=0,04$, *two-way* ANOVA).

4.2.6 Adipócitos

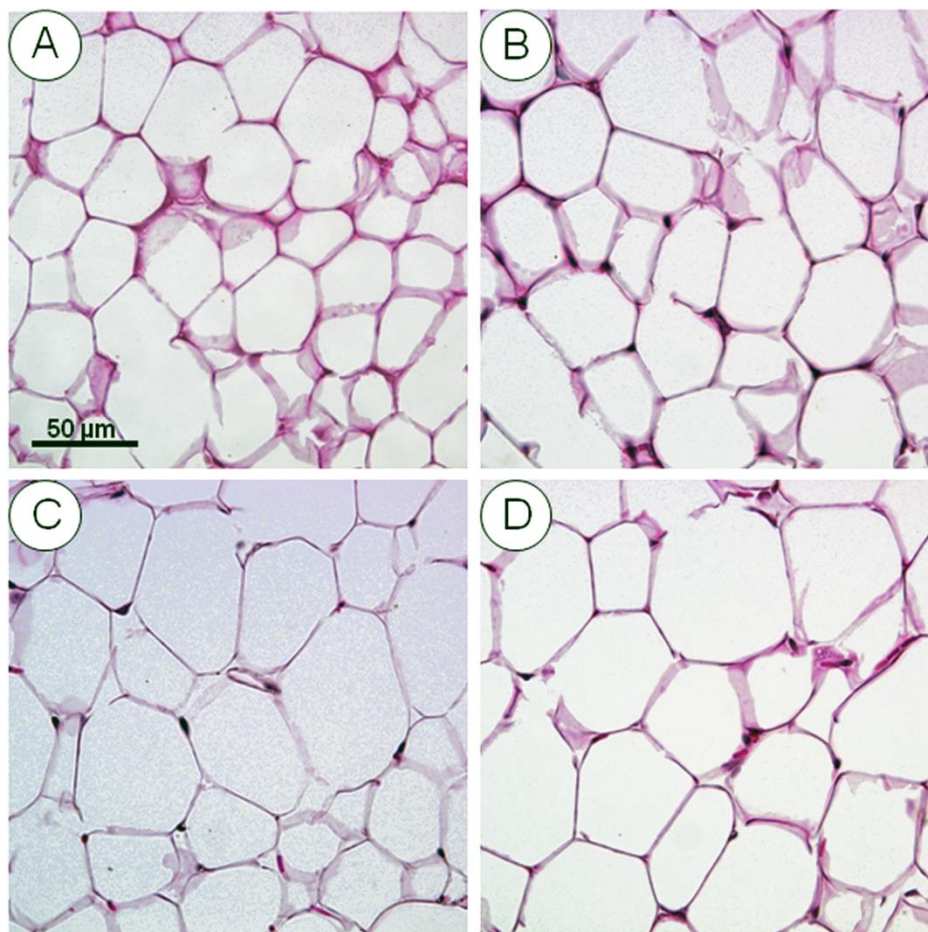
A morfologia do tecido adiposo por microscopia de luz demonstrou aumento de 60% no diâmetro médio dos adipócitos nos grupos **HF** macho e **HF** fêmea ($P<0,0001$) quando comparados aos grupos **SC**, indicando hipertrofia de adipócitos nestes animais (Figura 12). A dieta materna e o gênero influenciaram significativamente o tamanho dos adipócitos ($P<0,001$, *two-way* ANOVA), havendo interação entre a dieta materna e o gênero para a variável descrita ($P=0,01$, *two-way* ANOVA). As diferenças morfológicas podem ser observadas nas fotomicrografias do tecido adiposo representadas na Figura 13.

Figura 12 - Área seccional média dos adipócitos das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Os dados foram expressos em média \pm EPM. Diferenças foram testadas com Análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P<0,0001$), símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P<0,0001$).

Figura 13 - Fotomicrografias do tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Coloração HE. Mesmo aumento (barra = 50μm). A – Filhotes **SC** macho e B – Filhotes **SC** fêmea, ambos os grupos apresentando aspecto normal dos adipócitos. C – Filhotes **HF** macho e D – Filhotes **HF** fêmea, ambos os grupos apresentando adipócitos hipertrofiados.

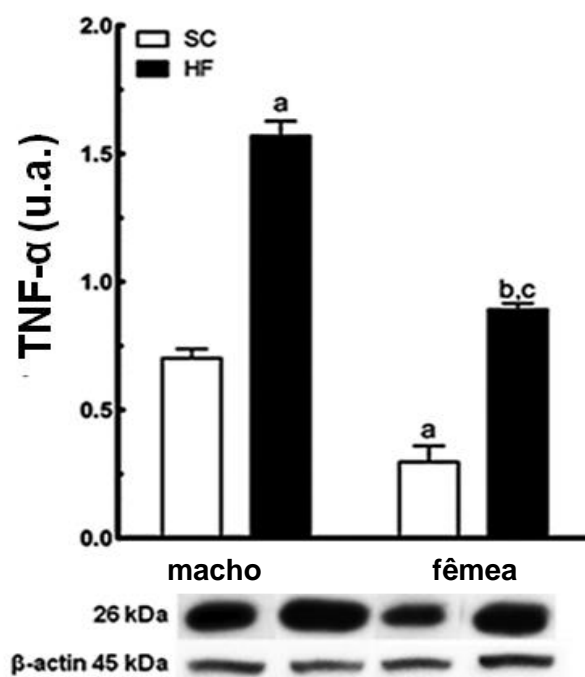
4.2.7 Expressão de adipocinas do tecido adiposo genital

As expressões proteicas de TNF-alfa, IL-6, adiponectina e leptina foram obtidas no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade.

A expressão da adipocina TNF-alfa variou nos machos de $0,70 \pm 0,08$ u.a. (grupo **SC**) a $1,57 \pm 0,13$ u.a. (grupo **HF**) (+125%; $P < 0,001$) e nas fêmeas de $0,30 \pm 0,14$ u.a. (grupo **SC**) a $0,89 \pm 0,05$ u.a. (grupo **HF**) (+200%, $P < 0,001$) (Figura 14).

A dieta materna e o gênero influenciaram independentemente este parâmetro ($P < 0,0001$, *two-way* ANOVA), havendo interação entre a dieta materna e o gênero na expressão de TNF-alfa ($P = 0,01$, *two-way* ANOVA).

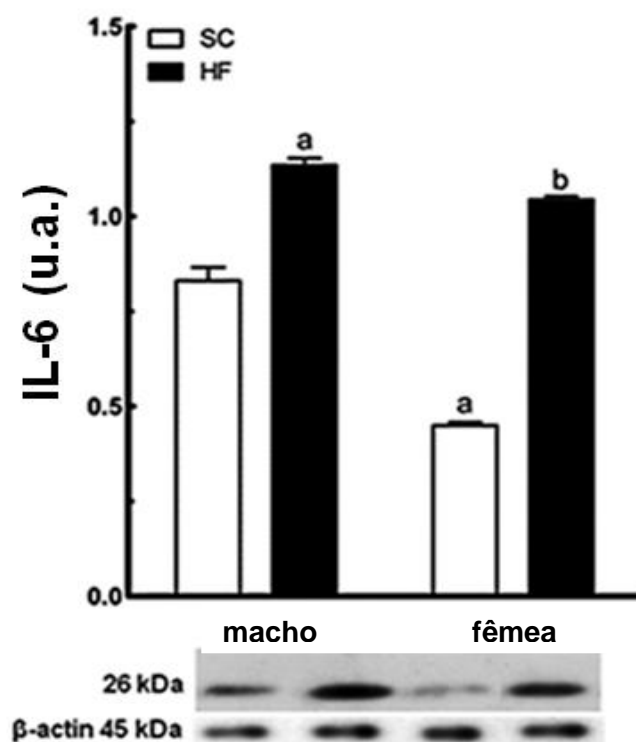
Figura 14 - Expressão de TNF-alfa no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Bandas representativas de western blotting correspondem aos grupos **SC** e **HF**, machos e fêmeas. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P < 0,001$), símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P < 0,01$) e símbolo [c] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **HF** macho ($P < 0,001$), dimorfismo sexual.

A expressão da proteína IL-6 no tecido adiposo genital variou em machos de $0,83 \pm 0,08$ u.a. (grupo **SC**) a $1,14 \pm 0,04$ u.a. (grupo **HF**) (+40%; $P < 0,05$) e em fêmeas de $0,45 \pm 0,02$ u.a. (grupo **SC**) a $1,04 \pm 0,02$ u.a. (grupo **HF**) (+130%, $P < 0,001$) (Figura 15). A dieta materna e o gênero afetaram independentemente a expressão de IL-6 ($P < 0,0001$, *two-way* ANOVA), assim como houve interação entre esses dois fatores sobre a IL-6 ($P < 0,0001$, *two-way* ANOVA).

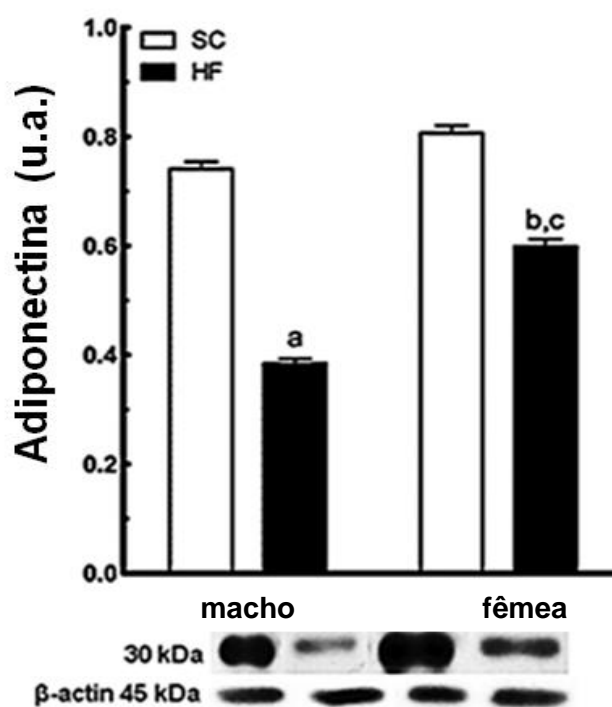
Figura 15 - Expressão de IL-6 no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Bandas representativas de western blotting correspondem aos grupos **SC** e **HF**, machos e fêmeas. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P < 0,05$), símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P < 0,001$).

Quanto à adiponectina, uma citocina anti-inflamatória, houve variação em machos de $0,74 \pm 0,03$ u.a. (grupo SC) a $0,38 \pm 0,02$ u.a. (grupo HF) (-50%; $P < 0,001$) e em fêmeas de $0,81 \pm 0,03$ u.a. (grupo SC) a $0,60 \pm 0,03$ u.a. (grupo HF) (-25%, $P < 0,001$), como mostra a Figura 16. A dieta materna e o gênero influenciaram independentemente a expressão de adiponectina ($P < 0,0001$, *two-way ANOVA*), assim como houve interação entre a dieta materna e o gênero sobre a variável analisada ($P < 0,0001$, *two-way ANOVA*).

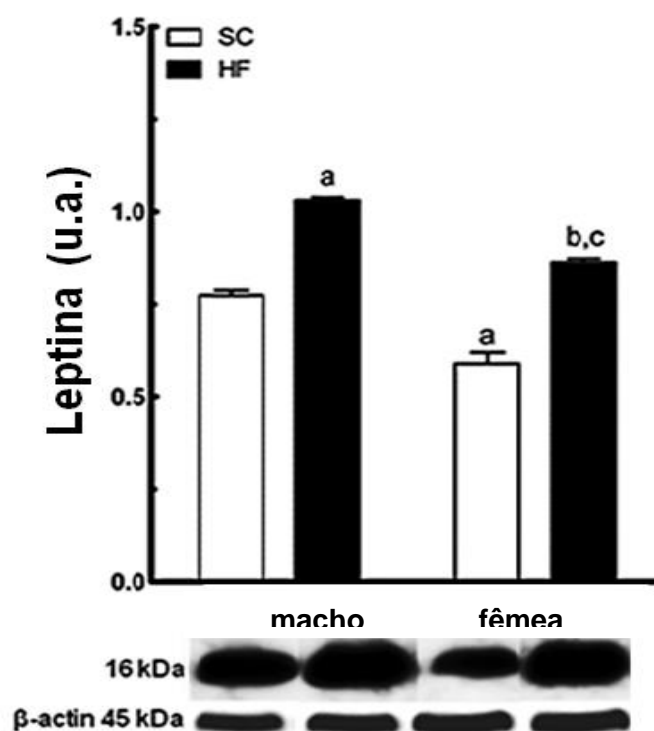
Figura 16 - Expressão de adiponectina no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Bandas representativas de western blotting correspondem aos grupos **SC** e **HF**, machos e fêmeas. Diferenças foram testadas com análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P < 0,001$), símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P < 0,001$) e símbolo [c] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **HF** macho ($P < 0,001$), dimorfismo sexual.

Adicionalmente, a expressão da proteína leptina variou nos machos de $0,77 \pm 0,03$ u.a. (grupo SC) a $1,03 \pm 0,02$ u.a. (grupo HF) (+35%; $P < 0,01$) e nas fêmeas de $0,59 \pm 0,07$ u.a. (grupo SC) a $0,86 \pm 0,02$ u.a. (grupo HF) (+45%, $P < 0,01$), ilustrado na Figura 17. A dieta e o gênero influenciaram independentemente a leptina ($P < 0,0001$, *two-way ANOVA*), porém não houve interação entre a dieta materna e o gênero para leptina ($P > 0,05$, *two-way ANOVA*).

Figura 17. Expressão de leptina no tecido adiposo genital das proles de machos e fêmeas aos três meses de idade



Legenda: Bandas representativas de western blotting correspondem aos grupos **SC** e **HF**, machos e fêmeas. Diferenças foram testadas com Análise de variância (one-way ANOVA) e pós-teste de Tukey. Símbolo [a] acima da barra significa diferença estatística em comparação com o grupo **SC** macho ($P < 0,01$), símbolo [b] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **SC** fêmea ($P < 0,01$) e símbolo [c] acima da barra significa diferença estatística em comparação com grupo **HF** macho ($P < 0,05$), dimorfismo sexual.

5 DISCUSSÃO

A obesidade materna induzida por dieta HF resultou em anormalidades metabólicas, alterações estruturais no fígado e tecido adiposo e em mudanças no perfil pró-inflamatório das proles de machos e fêmeas na vida adulta.

As progenitoras do grupo HF receberam dieta rica em lipídeos, com 49% da energia proveniente dos lipídeos, na qual 36% desta energia foi advinda da gordura saturada, equivalente a valores altos em relação a uma dieta normal em humanos (Samuelsson *et al.*, 2008). Torna-se imprescindível ressaltar que o aporte proteico tanto da dieta SC como da dieta HF (19% da energia total) garante o requerimento nutricional para os animais usados no trabalho, considerando que a diminuição de proteínas durante períodos críticos de desenvolvimento pode favorecer o surgimento de doenças crônicas na prole adulta (Catta-Preta *et al.*, 2006; Gregorio *et al.*, 2008).

Neste contexto, a obesidade materna e alterações metabólicas associadas, tais como intolerância à glicose, resultam em doenças futuras nas proles, diferentemente expressas de acordo com a idade e gênero do indivíduo (Brion *et al.*, 2010; Gallou-Kabani *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011). Estudos experimentais demonstram que progenitoras alimentadas com dieta HF apresentam hiperglicemia e elevação da insulina plasmática (Cerf, 2010). Entretanto, somente a glicose materna consegue transpor a placenta, enquanto que a insulina não, causando precocemente no feto uma maior estimulação das células-beta pancreáticas fetais, fenômeno, que, em longo prazo pode ser responsável pelas desordens metabólicas resultantes da programação fetal (Yessoufou e Moutairou, 2011).

Várias teorias têm sido propostas para elucidar como machos e fêmeas respondem de forma diferente a insultos maternos, tal como a obesidade materna no período de desenvolvimento. Pesquisadores sugerem que durante a fase de pré-implantação, embriões do gênero masculino podem ter maior capacidade de se adequar ao ambiente materno e, como consequência, apresentar maior sensibilidade a influências específicas da programação (Luyckx e Brenner, 2005; Grigore *et al.*, 2008). Alterações genéticas na placenta podem ocorrer, uma vez que fetos do gênero feminino apresentam placentas mais facilmente adaptadas a condições intrauterinas desfavoráveis, preservando o transporte de nutrientes, sem

interferir no seu crescimento e desenvolvimento (Murphy *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2009).

Estudos epigenéticos vêm destacando que um cromossomo X relacionado a doenças em mulheres pode ser seletivamente inativado durante o período de embriogênese, especialmente em situações intrauterinas adversas, resultando em vantagens e benefícios para o gênero feminino que também é protegido pelos hormônios sexuais correspondentes (Looijenga *et al.*, 1999; Migeon *et al.*, 2005; Clifton, 2010).

Nossos resultados demonstraram que a dieta materna HF teve um efeito pronunciado na programação dos filhotes, com elevação precoce da massa corporal das proles HF, independentemente do gênero. Outros estudos do nosso grupo que utilizaram uma linha semelhante de investigação, iniciando a rotina dietética durante gestação e/ou lactação demonstraram diferença no ganho de peso também a partir da quarta semana de vida (Gregorio *et al.*, 2010; Volpato *et al.*, 2012). Resultado similar foi encontrado no atual trabalho, no qual as progenitoras tiveram um tempo maior de consumo de dieta HF. Em adição, o comportamento hiperfágico observado na prole HF justifica o aumento do tecido adiposo e da massa corporal, sendo os machos mais pesados que as fêmeas, fato já demonstrado em populações humanas e em camundongos (Wells, 2007, 2012).

O acúmulo e a distribuição de gordura mostraram-se dimórficos sexualmente. Fêmeas HF tiveram maior índice de adiposidade (aumento no percentual de gordura corporal) que concorda com estudo prévio (Macotela *et al.*, 2009). Machos acumulam mais gordura visceral, com um risco aumentado para várias morbidades médicas, incluindo a síndrome metabólica (von Eyben *et al.*, 2003).

Existe relação entre o acúmulo de gordura visceral e intolerância à glicose (Kang *et al.*, 2011; Saad e Gooren, 2011), ratificando os resultados obtidos neste estudo, em que os filhotes machos de mães obesas apresentaram maior relação de gordura genital/inguinal e intolerância à glicose. Esses achados sugerem o papel importante da dieta materna hiperlipídica em promover o aumento da massa e da expansão do tecido adiposo na prole e concordam com dados da literatura demonstrando a programação da morfologia do tecido adiposo pelo excedente energético disponível no início da vida (Conceicao *et al.*, 2011).

A obesidade materna pode programar o perfil lipídico dos descendentes, que passam a apresentar hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (Samuelsson *et al.*, 2008), fatos evidenciados nas proles HF. Alterações na expressão gênica do ativador de proliferação peroxissomal (PPAR) em proles de mães obesas são encontradas, contribuindo para distúrbios no metabolismo lipídico. Neste contexto, há um decréscimo na expressão hepática do PPAR-alfa, negativamente correlacionados com TG séricos (Yamaguchi *et al.*, 2010). No entanto, a concentração plasmática de TG no grupo HF fêmea permaneceu inalterada tal como confirmado por Taylor e colaboradores, podendo apresentar variações com o curso do envelhecimento (Taylor *et al.*, 2005).

Existe uma relação entre obesidade materna e hiperinsulinemia na prole, caracterizando um quadro de resistência à insulina e prejuízos na homeostase da glicose (Cerf, 2010), como visto no presente trabalho. Nossos resultados mostraram que a hiperinsulinemia foi observada apenas nos machos HF, indicando dimorfismo sexual na prole programada pela obesidade materna. Inúmeros mecanismos têm sido propostos para elucidar como a sensibilidade à insulina pode ser gênero-dependente. Mesmo com um maior percentual de gordura corporal, mulheres e roedores do gênero feminino têm maior sensibilidade à insulina do que o gênero oposto (Boyns *et al.*, 1969; Yki-Jarvinen, 1984). Geralmente o gênero feminino é mais resistente à intolerância à glicose e mais sensível à insulina e o gênero masculino é três vezes mais propenso a desenvolver alterações precoces no metabolismo de carboidratos (Kuhl *et al.*, 2005). O aumento plasmático de adiponectina nas fêmeas HF poderia justificar maior sensibilidade à insulina, uma vez que a adiponectina caracteriza-se como uma adipocina insulino-sensibilizadora, além de inibidora da produção de glicose hepática, contribuindo, assim, para a melhora na homeostase da glicose (Ferezou-Viala *et al.*, 2007; Howie *et al.*, 2009).

A dieta materna hiperlipídica é responsável por conferir resistência hipotalâmica à leptina na descendência, levando ao ganho de peso na idade adulta (Ferezou-Viala *et al.*, 2007; Howie *et al.*, 2009). No nosso trabalho, a elevação da leptina plasmática observada apenas nos machos configura dimorfismo sexual. Este resultado pode ser explicado por um estudo prévio que demonstrou diminuição da expressão do OB-Rb, um receptor de leptina, em camundongos machos, resultando na diminuição da sensibilidade à leptina. Este achado pode explicar o fato do gênero masculino

possuir maior tendência para desenvolver distúrbios ligados à obesidade (Priego *et al.*, 2009).

Os grupos HF macho e HF fêmea apresentaram incremento da massa do fígado, que reflete um sinal inicial do efeito adverso de dietas ricas em ácidos graxos saturados (Gauthier *et al.*, 2006). O acúmulo de TG no fígado (esteatose) observado na prole adulta das mães alimentadas com dieta HF, corrobora com os dados obtidos no presente estudo (Charney *et al.*, 1976). A esteatose hepática foi estimada através de método estereológico. O método de quantificação usado foi recentemente confirmado na literatura como muito adequado a esta mensuração (Catta-Preta *et al.*, 2011). A dieta HF durante o período pré-gestacional até o final da lactação favoreceu o aumento de 27% e 25% da esteatose hepática em machos e fêmeas, respectivamente. Esses resultados foram confirmados pela quantificação das concentrações do TG hepático.

Alguns modelos utilizam animais para correlacionar o ambiente intrauterino e o desenvolvimento de DHGNA (Hartil *et al.*, 2009; McCurdy *et al.*, 2009). Um aumento na regulação do transporte de nutrientes pela placenta constitui o fator desencadeante desta doença (Jones *et al.*, 2009). Considerando a progressão da esteatose hepática, outras alterações são esperadas, como disfunção microvascular (mudanças nos sinusóides hepáticos) e ativação de células estreladas (McCuskey *et al.*, 2004).

No que concerne o tecido adiposo genital, houve hipertrofia dos adipócitos nos filhotes HF independente do gênero dos animais. A literatura documenta a relação entre o diâmetro dos adipócitos e a secreção de adipocinas, sendo diretamente proporcional (Rotter *et al.*, 2003), o que enfatiza o envolvimento do tecido adiposo nos processos inflamatórios inerentes à obesidade (Strissel *et al.*, 2007; Symonds *et al.*, 2012b). Portanto, as adipocinas desempenham um papel relevante na homeostase energética, na sensibilidade à insulina, na resposta imune e na doença vascular (Guerre-Millo, 2004; Fantuzzi, 2005), podendo ser expressa de maneira diferente segundo o gênero. Observou-se na descendência das mães obesas aumento da expressão de adipocinas pró-inflamatórias, diretamente envolvidas com a obesidade e resistência à insulina, tais como TNF-alfa e IL-6 (Hotamisligil *et al.*, 1995; Andersson *et al.*, 2008), que foram mais expressas nos filhotes machos HF. Por outro lado, a maior expressão e dos níveis circulantes de adiponectina nas

fêmeas HF, em comparação ao respectivo contrapartido pode ser responsável pela diminuição dos níveis do TNF-alfa, sendo um fator de proteção para as fêmeas programadas pela obesidade materna (Bruun *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2005).

Com respeito ao perfil pró-inflamatório, as fêmeas HF foram menos afetadas do que os machos HF, sugerindo que a ação do hormônio estrogênio as protege da resistência à insulina e inflamação (Medrikova *et al.*, 2012; Stubbins *et al.*, 2012). A diminuição da expressão de adiponectina, vista na prole de mães obesas poderia ser o primeiro sinal de progressão em direção a uma cascata de alteração metabólica, conforme indicado em estudo prévio (El Akoum *et al.*, 2011).

Em resumo, a dieta HF administrada às progenitoras antes e durante os períodos de gestação e lactação em camundongos leva à obesidade e suas conseqüências nos filhotes, como alterações morfológicas, bioquímicas e metabólicas do tecido adiposo e fígado, intensificando o estado pró-inflamatório em descendentes do gênero masculino e feminino na idade adulta. Permite-se sugerir, a partir dos achados, que o gênero masculino é mais afetado, enquanto que as fêmeas podem ser mais influenciadas em longo prazo. Portanto, a obesidade materna deve ser considerada não apenas um problema para a própria mãe, mas uma preocupação real para a saúde pública, com profundas conseqüências na vida dos filhos gerados.

CONCLUSÕES

Dieta materna hiperlipídica no período pré-gestacional até o final da lactação causa nas proles de machos e fêmeas, aos três meses de idade:

- a) aumento da massa corporal a partir da quarta semana de vida em ambos os gêneros;
- b) hiperfagia alimentar em ambos os gêneros, sendo mais pronunciada em machos;
- c) alterações do metabolismo glicídico, com hiperglicemia e aumento da área sob a curva do TOTG, sendo os machos mais intolerantes à glicose;
- d) hiperinsulinemia e hipertrigliceridemia, somente em machos e aumento do colesterol total em ambos os gêneros;
- e) desenvolvimento de esteatose hepática e elevação de triglicérides hepáticos em ambos os gêneros;
- f) aumento do tecido adiposo total e genital com hipertrofia dos adipócitos em ambos os gêneros;
- g) aumento da expressão no tecido adiposo genital de TNF- α e IL-6, sendo que os machos apresentam maior expressão que as fêmeas;
- h) aumento da expressão de leptina no tecido adiposo genital, principalmente em machos, com diminuição de adiponectina, mais notável na prole do gênero masculino.

REFERÊNCIAS

- Alberti KG, Zimmet P, Shaw J. Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 2006; 23:469-480.
- Anderssen SA, Engeland A, Sogaard AJ, Nystad W, Graff-Iversen S, Holme I. Changes in physical activity behavior and the development of body mass index during the last 30 years in Norway. *Scand J Med Sci Sports* 2008; 18:309-317.
- Andersson CX, Gustafson B, Hammarstedt A, Hedjazifar S, Smith U. Inflamed adipose tissue, insulin resistance and vascular injury. *Diabetes Metab Res Rev* 2008; 24:595-603.
- Armitage JA, Khan IY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol* 2004; 561:355-377.
- Arner P. The adipocyte in insulin resistance: key molecules and the impact of the thiazolidinediones. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14:137-145.
- Barker DJ. Intrauterine programming of adult disease. *Mol Med Today* 1995; 1:418-423.
- Barker DJ. In utero programming of chronic disease. *Clin Sci (Lond)* 1998; 95:115-128.
- Barker DJ, Bull AR, Osmond C, Simmonds SJ. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *BMJ* 1990; 301:259-262.
- Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod* 1997; 2:105-112.
- Barker DJ, Gluckman PD, Godfrey KM, Harding JE, Owens JA, Robinson JS. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet* 1993; 341:938-941.
- Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 1986; 1:1077-1081.
- Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland NC. A maternal "junk food" diet in pregnancy and lactation promotes nonalcoholic Fatty liver disease in rat offspring. *Endocrinology* 2010; 151:1451-1461.
- Beck B, Kozak R, Moar KM, Mercer JG. Hypothalamic orexigenic peptides are overexpressed in young Long-Evans rats after early life exposure to fat-rich diets. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 342:452-458.

Bispham J, Budge H, Mostyn A, Dandrea J, Clarke L, Keisler DH, Symonds ME, Stephenson T. Ambient temperature, maternal dexamethasone, and postnatal ontogeny of leptin in the neonatal lamb. *Pediatr Res* 2002; 52:85-90.

Boyns DR, Crossley JN, Abrams ME, Jarrett RJ, Keen H. Oral glucose tolerance and related factors in a normal population sample. I. Blood sugar, plasma insulin, glyceride, and cholesterol measurements and the effects of age and sex. *Br Med J* 1969; 1:595-598.

Brion MJ, Ness AR, Rogers I, Emmett P, Cribb V, Davey Smith G, Lawlor DA. Maternal macronutrient and energy intakes in pregnancy and offspring intake at 10 y: exploring parental comparisons and prenatal effects. *Am J Clin Nutr* 2010; 91:748-756.

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest* 2004; 114:147-152.

Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA, McConnell JM, Byrne CD. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* 2009; 50:1796-1808.

Bruun JM, Lihn AS, Verdich C, Pedersen SB, Toubro S, Astrup A, Richelsen B. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:E527-533.
Burt AD, Mutton A, Day CP. Diagnosis and interpretation of steatosis and steatohepatitis. *Semin Diagn Pathol* 1998; 15:246-258.

Byrne CD, Olufadi R, Bruce KD, Cagampang FR, Ahmed MH. Metabolic disturbances in non-alcoholic fatty liver disease. *Clin Sci (Lond)* 2009; 116:539-564.
Caldwell SH, Swerdlow RH, Khan EM, Iezzoni JC, Hespdenheide EE, Parks JK, Parker WD, Jr. Mitochondrial abnormalities in non-alcoholic steatohepatitis. *J Hepatol* 1999; 31:430-434.

Cambonie G, Comte B, Zyzdorzcyk C, Ntimbane T, Germain N, Le NL, Pladys P, Gauthier C, Lahaie I, Abran D, Lavoie JC, Nuyt AM. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 292:R1236-1245.

Catalano PM, Ehrenberg HM. The short- and long-term implications of maternal obesity on the mother and her offspring. *BJOG* 2006; 113:1126-1133.

Catta-Preta M, Mendonca LS, Fraulob-Aquino J, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A critical analysis of three quantitative methods of assessment of hepatic steatosis in liver biopsies. *Virchows Arch* 2011; 459:477-485.

Catta-Preta M, Oliveira DA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Adult cardiorenal benefits from postnatal fish oil supplement in rat offspring of low-protein pregnancies. *Life Sci* 2006; 80:219-229.

Cerf ME. High fat programming of beta-cell failure. *Adv Exp Med Biol* 2010; 654:77-89.

Charlton M. Nonalcoholic fatty liver disease: a review of current understanding and future impact. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2004; 2:1048-1058.

Charlton M. Fetal obesity syndrome: maternal nutrition as a cause of nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2009; 50:1696-1698.

Charney E, Goodman HC, McBride M, Lyon B, Pratt R. Childhood antecedents of adult obesity. Do chubby infants become obese adults? *N Engl J Med* 1976; 295:6-9. Clifton VL. Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* 2010; 31 Suppl:S33-39.

Conceicao EP, Trevenzoli IH, Oliveira E, Franco JG, Carlos AS, Nascimento-Saba CC, Moura EG, Lisboa PC. Higher white adipocyte area and lower leptin production in adult rats overfed during lactation. *Horm Metab Res* 2011; 43:513-516.

Constancia M, Angiolini E, Sandovici I, Smith P, Smith R, Kelsey G, Dean W, Ferguson-Smith A, Sibley CP, Reik W, Fowden A. Adaptation of nutrient supply to fetal demand in the mouse involves interaction between the Igf2 gene and placental transporter systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:19219-19224.

de Onis M, Blossner M. Prevalence and trends of overweight among preschool children in developing countries. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:1032-1039.

Di Renzo GC, Rosati A, Sarti RD, Cruciani L, Cutuli AM. Does fetal sex affect pregnancy outcome? *Gend Med* 2007; 4:19-30.

Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. *Endocrinology* 2009; 150:4999-5009.

El Akoum S, Lamontagne V, Cloutier I, Tanguay JF. Nature of fatty acids in high fat diets differentially delineates obesity-linked metabolic syndrome components in male and female C57BL/6J mice. *Diabetol Metab Syndr* 2011; 3:34.

Fantuzzi G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115:911-919; quiz 920.

Ferezou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Djiane J, Riottot M, Taouis M. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293:R1056-1062.

Festi D, Colecchia A, Sacco T, Bondi M, Roda E, Marchesini G. Hepatic steatosis in obese patients: clinical aspects and prognostic significance. *Obes Rev* 2004; 5:27-42.

Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:737-744.

Flamment M, Rieusset J, Vidal H, Simard G, Malthiery Y, Fromenty B, Ducluzeau PH. Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a high fat diet: a longitudinal study in rats. *J Physiol Biochem* 2012 (doi: 10.1007/s13105-012-0145-3).
Fox KR, Hillsdon M. Physical activity and obesity. *Obes Rev* 2007; 8 Suppl 1:115-121.

Fraulob JC, Ogg-Diamantino R, Fernandes-Santos C, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. A Mouse Model of Metabolic Syndrome: Insulin Resistance, Fatty Liver and Non-Alcoholic Fatty Pancreas Disease (NAFPD) in C57BL/6 Mice Fed a High Fat Diet. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46:212-223.

Freeman DJ. Effects of maternal obesity on fetal growth and body composition: implications for programming and future health. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15:113-118.

Gabory A, Attig L, Junien C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 304:8-18.

Gallou-Kabani C, Gabory A, Tost J, Karimi M, Mayeur S, Lesage J, Boudadi E, Gross MS, Taurelle J, Vige A, Breton C, Reusens B, Remacle C, Vieau D, Ekstrom TJ, Jais JP, Junien C. Sex- and diet-specific changes of imprinted gene expression and DNA methylation in mouse placenta under a high-fat diet. *PLoS One* 2010; 5:e14398.

Gauthier MS, Favier R, Lavoie JM. Time course of the development of non-alcoholic hepatic steatosis in response to high-fat diet-induced obesity in rats. *Br J Nutr* 2006; 95:273-281.

Giorgino F, Laviola L, Eriksson JW. Regional differences of insulin action in adipose tissue: insights from in vivo and in vitro studies. *Acta Physiol Scand* 2005; 183:13-30.

Goodpaster BH, Krishnaswami S, Harris TB, Katsiaras A, Kritchevsky SB, Simonsick EM, Nevitt M, Holvoet P, Newman AB. Obesity, regional body fat distribution, and the metabolic syndrome in older men and women. *Arch Intern Med* 2005; 165:777-783.

Gregorio BM, Souza-Mello V, Carvalho JJ, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat intake predisposes nonalcoholic fatty liver disease in C57BL/6 offspring. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203:495 e491-498.

Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal fish oil supplementation benefits programmed offspring from rat dams fed low-protein diet. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 199:82 e81-87.

Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *Eur J Nutr* 2012 (doi: 10.1007/s00394-012-0382-9).

Grigore D, Ojeda NB, Alexander BT. Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gend Med* 2008; 5 Suppl A:S121-132.

Grove KL, Fried SK, Greenberg AS, Xiao XQ, Clegg DJ. A microarray analysis of sexual dimorphism of adipose tissues in high-fat-diet-induced obese mice. *Int J Obes (Lond)* 2010; 34:989-1000.

Guerre-Millo M. Adipose tissue and adipokines: for better or worse. *Diabetes Metab* 2004; 30:13-19.

Hartil K, Vuguin PM, Kruse M, Schmucl E, Fiallo A, Vargas C, Warner MJ, Durand JL, Jelicks LA, Charron MJ. Maternal substrate utilization programs the development of the metabolic syndrome in male mice exposed to high fat in utero. *Pediatr Res* 2009; 66:368-373.

Hauner H. The new concept of adipose tissue function. *Physiol Behav* 2004; 83:653-658.

Havel PJ. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. *Diabetes* 2004; 53 Suppl 1:S143-151.

Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor- α in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 1995; 95:2409-2415.

Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol* 2009; 587:905-915.

Jones HN, Woollett LA, Barbour N, Prasad PD, Powell TL, Jansson T. High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB J* 2009; 23:271-278.

Junien C, Gabory A, Attig L. [Sexual dimorphism in the XXI(st) century]. *Med Sci (Paris)* 2012; 28:185-192.

Kang SM, Yoon JW, Ahn HY, Kim SY, Lee KH, Shin H, Choi SH, Park KS, Jang HC, Lim S. Android fat depot is more closely associated with metabolic syndrome than abdominal visceral fat in elderly people. *PLoS One* 2011; 6:e27694.

Kasuga M. Insulin resistance and pancreatic beta cell failure. *J Clin Invest* 2006; 116:1756-1760.

Keding GB, Msuya JM, Maass BL, Krawinkel MB. Dietary patterns and nutritional health of women: the nutrition transition in rural Tanzania. *Food Nutr Bull* 2011; 32:218-226.

Kelley DE, Thaete FL, Troost F, Huwe T, Goodpaster BH. Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 278:E941-948.

Kimm SY, Obarzanek E. Childhood obesity: a new pandemic of the new millennium. *Pediatrics* 2002; 110:1003-1007.

Korotkova M, Gabrielsson BG, Holmang A, Larsson BM, Hanson LA, Strandvik B. Gender-related long-term effects in adult rats by perinatal dietary ratio of n-6/n-3 fatty acids. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R575-579.

Kozak LP, Koza RA, Anunciado-Koza R, Mendoza T, Newman S. Inherent plasticity of brown adipogenesis in white fat of mice allows for recovery from effects of post-natal malnutrition. *PLoS One* 2012; 7:e30392.

Krasnow SM, Nguyen ML, Marks DL. Increased maternal fat consumption during pregnancy alters body composition in neonatal mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301:E1243-1253.

Kuhl J, Hilding A, Ostenson CG, Grill V, Efendic S, Bavenholm P. Characterisation of subjects with early abnormalities of glucose tolerance in the Stockholm Diabetes Prevention Programme: the impact of sex and type 2 diabetes heredity. *Diabetologia* 2005; 48:35-40.

Lambin S, van Bree R, Caluwaerts S, Vercruyse L, Vergote I, Verhaeghe J. Adipose tissue in offspring of *Lepr(db/+)* mice: early-life environment vs. genotype. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007; 292:E262-271.

Langley-Evans SC, Gardner DS, Jackson AA. Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Nutr* 1996; 126:1578-1585.

Langley-Evans SC, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract* 2010; 19:87-98.

Laraia BA, Bodnar LM, Siega-Riz AM. Pregravid body mass index is negatively associated with diet quality during pregnancy. *Public Health Nutr* 2007; 10:920-926.

Lerario DD, Gimeno SG, Franco LJ, Iunes M, Ferreira SR. [Weight excess and abdominal fat in the metabolic syndrome among Japanese-Brazilians]. *Rev Saude Publica* 2002; 36:4-11.

Lewis DS, Bertrand HA, McMahan CA, McGill HC, Jr., Carey KD, Masoro EJ. Prewaning food intake influences the adiposity of young adult baboons. *J Clin Invest* 1986; 78:899-905.

Li M, Sloboda DM, Vickers MH. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: evidence from animal models. *Exp Diabetes Res* 2011; 2011:592408.

Long NM, Rule DC, Zhu MJ, Nathanielsz PW, Ford SP. Maternal obesity upregulates fatty acid and glucose transporters and increases expression of enzymes mediating fatty acid biosynthesis in fetal adipose tissue depots. *J Anim Sci* 2012 (doi: 10.1007/s13105-012-0145-3)

- Looijenga LH, Gillis AJ, Verkerk AJ, van Putten WL, Oosterhuis JW. Heterogeneous X inactivation in trophoblastic cells of human full-term female placentas. *Am J Hum Genet* 1999; 64:1445-1452.
- Lucas A. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp* 1991; 156:38-50; discussion 50-35.
- Luyckx VA, Brenner BM. Low birth weight, nephron number, and kidney disease. *Kidney Int Suppl* 2005:S68-77.
- Macotela Y, Boucher J, Tran TT, Kahn CR. Sex and depot differences in adipocyte insulin sensitivity and glucose metabolism. *Diabetes* 2009; 58:803-812.
- Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M, McCullough AJ, Natale S, Forlani G, Melchionda N. Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome. *Diabetes* 2001; 50:1844-1850.
- McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Smith MS, Friedman JE, Grove KL. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest* 2009; 119:323-335.
- McCuskey RS, Ito Y, Robertson GR, McCuskey MK, Perry M, Farrell GC. Hepatic microvascular dysfunction during evolution of dietary steatohepatitis in mice. *Hepatology* 2004; 40:386-393.
- Medrikova D, Jilkova ZM, Bardova K, Janovska P, Rossmeisl M, Kopecky J. Sex differences during the course of diet-induced obesity in mice: adipose tissue expandability and glycemic control. *Int J Obes (Lond)* 2012; 36:262-272.
- Migeon BR, Axelman J, Jeppesen P. Differential X reactivation in human placental cells: implications for reversal of X inactivation. *Am J Hum Genet* 2005; 77:355-364.
- Mlinar B, Marc J. Review: New insights into adipose tissue dysfunction in insulin resistance. *Clin Chem Lab Med* 2011(doi: 10.1515/CCLM.2011.697).
- Montague CT, Prins JB, Sanders L, Zhang J, Sewter CP, Digby J, Byrne CD, O'Rahilly S. Depot-related gene expression in human subcutaneous and omental adipocytes. *Diabetes* 1998; 47:1384-1391.
- Murphy VE, Johnson RF, Wang YC, Akinsanya K, Gibson PG, Smith R, Clifton VL. The effect of maternal asthma on placental and cord blood protein profiles. *J Soc Gynecol Investig* 2005; 12:349-355.
- Musso G, Gambino R, Cassader M. Recent insights into hepatic lipid metabolism in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Prog Lipid Res* 2009; 48:1-26.
- Neyrinck AM, Bindels LB, De Backer F, Pachikian BD, Cani PD, Delzenne NM. Dietary supplementation with chitosan derived from mushrooms changes adipocytokine profile in diet-induced obese mice, a phenomenon linked to its lipid-lowering action. *Int Immunopharmacol* 2009; 9:767-773.

Oben JA, Patel T, Muralidarane A, Samuelsson AM, Matthews P, Pombo J, Morgan M, McKee C, Soeda J, Novelli M, Poston L, Taylor P. Maternal obesity programmes offspring development of non-alcoholic fatty pancreas disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 394:24-28.

Oleszczuk A, Spannauer M, Tannapfel A, Bluher M, Hengstler J, Pietsch UC, Schuhmacher A, Wittekind C, Hauss JP, Schon MR. Regenerative capacity differs between micro- and macrovesicular hepatic steatosis. *Exp Toxicol Pathol* 2007; 59:205-213.

Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Murohara T. Adipocytokines and obesity-linked disorders. *Nagoya J Med Sci* 2012; 74:19-30.

Paredes AH, Torres DM, Harrison SA. Nonalcoholic Fatty liver disease. *Clin Liver Dis* 2012; 16:397-419.

Perez-Carreras M, Del Hoyo P, Martin MA, Rubio JC, Martin A, Castellano G, Colina F, Arenas J, Solis-Herruzo JA. Defective hepatic mitochondrial respiratory chain in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003; 38:999-1007.

Pettinelli P, Obregon AM, Videla LA. Molecular mechanisms of steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Hosp* 2011; 26:441-450.

Plavcan JM. Understanding dimorphism as a function of changes in male and female traits. *Evol Anthropol* 2011; 20:143-155.

Popkin BM. Global nutrition dynamics: the world is shifting rapidly toward a diet linked with noncommunicable diseases. *Am J Clin Nutr* 2006; 84:289-298.

Power GG. Biology of temperature: the mammalian fetus. *J Dev Physiol* 1989; 12:295-304.

Priego T, Sanchez J, Palou A, Pico C. Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: depot- and sex-related differential response. *Genes Nutr* 2009; 4:151-156.

Prins JB. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2002; 16:639-651.

Qasem RJ, Yablonski E, Li J, Tang HM, Pontiggia L, D'Mello A P. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav* 2012; 105:1182-1193.

Rao MS, Reddy JK. PPARalpha in the pathogenesis of fatty liver disease. *Hepatology* 2004; 40:783-786.

Rasouli N, Kern PA. Adipocytokines and the metabolic complications of obesity. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:S64-73.

Ravussin E, Smith SR. Increased fat intake, impaired fat oxidation, and failure of fat cell proliferation result in ectopic fat storage, insulin resistance, and type 2 diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 967:363-378.

Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123:1939-1951.

Reik W, Lewis A. Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet* 2005; 6:403-410.

Rotter V, Nagaev I, Smith U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. *J Biol Chem* 2003; 278:45777-45784.

Saad F, Gooren LJ. The role of testosterone in the etiology and treatment of obesity, the metabolic syndrome, and diabetes mellitus type 2. *J Obes* 2011 (doi: 10.1155/2011/471584).

Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowlerson A, Poston L, Taylor PD. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension* 2008; 51:383-392.

Sanyal A. Nonalcoholic steatohepatitis. *Indian J Gastroenterol* 2001; 20 Suppl 1:C64-70.

Schreyer SA, Wilson DL, LeBoeuf RC. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1998; 136:17-24.

Scott NM, Hodyl NA, Murphy VE, Osei-Kumah A, Wyper H, Hodgson DM, Smith R, Clifton VL. Placental cytokine expression covaries with maternal asthma severity and fetal sex. *J Immunol* 2009; 182:1411-1420.

Seki Y, Williams L, Vuguin PM, Charron MJ. Minireview: epigenetic programming of diabetes and obesity: animal models. *Endocrinology* 2012; 153:1031-1038.

Serviddio G, Sastre J, Bellanti F, Vina J, Vendemiale G, Altomare E. Mitochondrial involvement in non-alcoholic steatohepatitis. *Mol Aspects Med* 2008; 29:22-35.

Sherlock S. Acute fatty liver of pregnancy and the microvesicular fat diseases. *Gut* 1983; 24:265-269.

Sherlock S. Alcoholic liver disease. *Lancet* 1995; 345:227-229.

Siemelink M, Verhoef A, Dormans JA, Span PN, Piersma AH. Dietary fatty acid composition during pregnancy and lactation in the rat programs growth and glucose metabolism in the offspring. *Diabetologia* 2002; 45:1397-1403.

Skurk T, Alberti-Huber C, Herder C, Hauner H. Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:1023-1033.

Smyth S, Heron A. Diabetes and obesity: the twin epidemics. *Nat Med* 2006; 12:75-80.

Sood R, Zehnder JL, Druzin ML, Brown PO. Gene expression patterns in human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:5478-5483.

Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguilu MB. Hepatic structural alteration in adult programmed offspring (severe maternal protein restriction) is aggravated by post-weaning high-fat diet. *Br J Nutr* 2007; 98:1159-1169.

Stevenson DK, Verter J, Fanaroff AA, Oh W, Ehrenkranz RA, Shankaran S, Donovan EF, Wright LL, Lemons JA, Tyson JE, Korones SB, Bauer CR, Stoll BJ, Papile LA. Sex differences in outcomes of very low birthweight infants: the newborn male disadvantage. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2000; 83:F182-185.

Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 2007; 56:2910-2918.

Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Nunez NP. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14:58-66.

Sullivan EL, Grove KL. Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr* 2010; 63:186-194.
Sullivan EL, Smith MS, Grove KL. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 2011; 93:1-8.

Symonds ME, Mostyn A, Pearce S, Budge H, Stephenson T. Endocrine and nutritional regulation of fetal adipose tissue development. *J Endocrinol* 2003; 179:293-299.

Symonds ME, Pope M, Sharkey D, Budge H. Adipose tissue and fetal programming. *Diabetologia* 2012a (doi: 10.1007/s00125-012-2505-5).

Symonds ME, Pope M, Sharkey D, Budge H. Adipose tissue and fetal programming. *Diabetologia* 2012b; 55:1597-1606.

Szyf M. The early life environment and the epigenome. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790:878-885.

Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawrence KM, Asare-Anane H, Persaud SJ, Jones PM, Petrie L, Hanson MA, Poston L. Impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R134-139.

Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. *Exp Physiol* 2007; 92:287-298.

Torres DM, Williams CD, Harrison SA. Features, Diagnosis, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012 (doi: 10.1016/2012/03011).

Tschanz SA, Burri PH, Weibel ER. A simple tool for stereological assessment of digital images: the STEPanizer. *J Microsc* 2011; 243:47-59.

Vague J. The degree of masculine differentiation of obesities: a factor determining predisposition to diabetes, atherosclerosis, gout, and uric calculous disease. *Am J Clin Nutr* 1956; 4:20-34.

Van Harmelen V, Reynisdottir S, Eriksson P, Thorne A, Hoffstedt J, Lonnqvist F, Arner P. Leptin secretion from subcutaneous and visceral adipose tissue in women. *Diabetes* 1998; 47:913-917.

Volpato AM, Schultz A, Magalhaes-da-Costa E, Correia ML, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal High-Fat Diet Programs for Metabolic Disturbances in Offspring despite Leptin Sensitivity. *Neuroendocrinology* 2012 (doi: 10.1159/000336377).

von Eyben FE, Mouritsen E, Holm J, Montvilas P, Dimcevski G, Suci G, Helleberg I, Kristensen L, von Eyben R. Intra-abdominal obesity and metabolic risk factors: a study of young adults. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003; 27:941-949.

Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000; 21:697-738.

Wells JC. Sexual dimorphism of body composition. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2007; 21:415-430.

Wells JC. Sexual dimorphism in body composition across human populations: Associations with climate and proxies for short- and long-term energy supply. *Am J Hum Biol* 2012.

Yamaguchi R, Nakagawa Y, Liu YJ, Fujisawa Y, Sai S, Nagata E, Sano S, Satake E, Matsushita R, Nakanishi T, Chapman KE, Seckl JR, Ohzeki T. Effects of maternal high-fat diet on serum lipid concentration and expression of peroxisomal proliferator-activated receptors in the early life of rat offspring. *Horm Metab Res* 2010; 42:821-825.

Yessoufou A, Moutairou K. Maternal diabetes in pregnancy: early and long-term outcomes on the offspring and the concept of "metabolic memory". *Exp Diabetes Res* 2011; 2011:218598.

Yki-Jarvinen H. Sex and insulin sensitivity. *Metabolism* 1984; 33:1011-1015.

Zambrano E, Bautista CJ, Deas M, Martinez-Samayoa PM, Gonzalez-Zamorano M, Ledesma H, Morales J, Larrea F, Nathanielsz PW. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex- and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. *J Physiol* 2006; 571:221-230.

Zar J. *Biostatistical analysis*, 4 edn ed: Prentice-Hall, Upper Saddle River, 1999: p. Zeng SM, Yankowitz J. X-inactivation patterns in human embryonic and extra-embryonic tissues. *Placenta* 2003; 24:270-275.

Zhang J, Wang C, Terroni PL, Cagampang FR, Hanson M, Byrne CD. High-unsaturated-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet during pregnancy and lactation modulates hepatic lipid metabolism in female adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288:R112-118.

Zhang Y, Proenca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432.

Zhao T, Hou M, Xia M, Wang Q, Zhu H, Xiao Y, Tang Z, Ma J, Ling W. Globular adiponectin decreases leptin-induced tumor necrosis factor- α expression by murine macrophages: involvement of cAMP-PKA and MAPK pathways. *Cell Immunol* 2005; 238:19-30.