Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Wilian Rodrigues Lannes

Obesidade materna aumenta a lipogênese e doença hepática gordurosa não alcoólica nos descendentes até a geração F2 de camundongos

Rio de Janeiro
2015

Wilian Rodrigues Lannes

Obesidade materna aumenta a lipogênese e doença hepática gordurosa não alcoólica nos descendentes até a geração F2 de camundongos

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.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Rio de Janeiro

2015

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

L292 Lannes, Wilian Rodrigues.
Obesidade materna aumenta a lipogênese e doença hepática gordurosa não alcoólica nos descendentes até a geração F2 de camundongos / Wilian Rodrigues Lannes. – 2015.
49 f.

Orientador: Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda.
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biologia Humana e Experimental.

1. Dieta Hiperlipídica - Teses. 2. Fenômenos Fisiológicos da Nutrição Pré-Natal - Genética. 3. Efeitos Tardios da Exposição Pré-Natal - Fisiopatologia. 4. Esteatose hepática - Aspectos nutricionais - Teses. 5. Obesidade - Prevenção - Teses. I. Mandarim-de-Lacerda, Carlos Alberto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.399

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

_____ _____

Assinatura Data

Wilian Rodrigues Lannes

Obesidade materna aumenta a lipogênese e doença hepática gordurosa não alcoólica nos descendentes até a geração F2 de camundongos

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 26 de agosto de 2015.

Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda (Orientador)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof.ª Dra. Sandra Barbosa da Silva

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Thiago da Silva Torres

Universidade Federal Fluminense

Rio de Janeiro

2015

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus familiares, principalmente à minha esposa que esteve ao meu lado nesse momento e suportou todas as fases do processo.

AGRADECIMENTOS

Aos familiares, uma base familiar é tudo que precisamos para seguir nesse caminho estreito, mas prazeroso, que é o conhecimento, passamos por momentos tão turbulentos que achamos que não vamos conseguir terminar o que foi iniciado.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda mais que um orientador, um homem tão dedicado e com tantas atribuições, teve a preocupação e a sensibilidade de transformar minha vida dando total apoio desde a graduação, mostrando que é importante se apoiar sobre o ombro de um gigante, com muito trabalho e dedicação que se chega ao sucesso, meu muito obrigado de coração.

A Professora Dra. Sandra Barbosa da Silva, que com toda a paciência do mundo, cobrou, e muito, mudando completamente me transformando em uma pessoa mais organizada e mostrando como que se deve comportar um pesquisador, meu muito obrigado.

A Professora Dra Márcia A. Mandarim-de-Lacerda, pelo incentivo e apoio nos momentos mais importantes ao longo da minha vida como parte do LMMC.

Ao Professor Francisco Sampaio, obrigado por fazer parte da minha trajetória, por ser fonte de inspiração e incentivo para ingressar nessa etapa da minha vida, obrigado.

As Professoras Dras Vanessa Mello e Isabele Bringhenti, obrigado pela ajuda, amizade e companheirismo, e pela boa vontade em esclarecer dúvidas, obrigado.

Aos amigos do LMMC, Aline Penna, com muita paciência e dedicação nas manhãs, juntos no desenvolvimento das técnicas.

André, uma pessoa sensacional amigo e sempre querendo ajudar com suas delicadezas o dia ao seu lado é sempre uma maravilha.

Celina pessoa maravilhosa, doce com suas palavras e atenciosa.

Fernanda Ornellas, sem palavras para falar dessa pessoa, amiga, atenciosa, sempre querendo ajudar, para você, um beijo no coração.

Jorge Medeiros, amigo, precisou de sua ajuda, pode contar!

Flavia Gombar, menina de futuro, inteligente, sempre tranquila na dela, estudando e desenvolvendo seus experimentos.

Dan, gente boa, amigo superinteligente e ótimo professor.

Helder, esse deixa nosso dia mais leve, com suas histórias.

Franciele Graus, pessoa dedicada, amiga, com sua voz meiga está sempre disposta a ajudar.

Tathiany de Sousa Marinho, meu muito obrigado pelos momentos no biotério sacrificando os animais, algo que deu origem ao desenvolvimento do trabalho.

Victor Faria Motta, meu muito obrigado você teve uma participação muito importante nesse processo, abraço muito grande.

Michele Moura Soares, mais de dez anos de amizade, por essa amizade de longos tempos acabou compartilhando dos momentos difíceis, sofreu com meus momentos, muito obrigado.

Verônica, Guilherme, Thereza, Thamiris, Fabiane, Iara, Carolina, Leia Barcellos, meus amigos, muito obrigado por esse momento, não se faz nada sozinho!

A todos os amigos que passaram pelo laboratório, em especial ao Ciro Reis e Cristiane.

Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei sobre os ombros de gigantes

Isaac Newton

RESUMO

LANNES, Wilian Rodrigues. *Obesidade materna aumenta a lipogênese e doença hepática gordurosa não alcoólica nos descendentes até a geração F2 de camundongos.* 49 f, 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências, Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2015.

A obesidade maternal induzida por dieta hiperlipídica programa a prole a suscetíveis doenças na vida adulta e pode passar para gerações subsequentes. O presente estudo avaliou o efeito da dieta materna sobre a estrutura hepática na prole adulta de camundongos, focando na primeira (F1) e segunda (F2) gerações. Fêmeas C57BL/6 (F0) foram alimentadas com dieta controle (SC) ou dieta hiperlipídica (HF) no período de 8 semanas antes do acasalamento, durante a gestação e a lactação para dar origem a primeira geração (SC-F1 e HF-F1). Aos 3 meses, as fêmeas F1 foram acasaladas e formaram a Segunda geração (SC-F2 e HF-F2). A partir do desmame todas a proles receberam apenas dieta controle. O fígado foi dissecado, pesado, foram realizados cortes de 5 µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina. O tecido hepático congelado foi utilizado para analisar o triglicerídeo hepático e expressão proteica por Western bloting. O grupo HF-F1 apresentou maior massa corporal (MC) aos 90 dias quando comparado ao grupo SC-F1 (P=0.001), no entanto a prole HF-F2 não apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo SC-F2.Quanto ao metabolismo de carboidratos, a prole HF-F1 mostrou-se intolerante à glicose comparada ao grupo SC-F1, no entanto esse resultado não foi observado na prole HF-F2. No entanto, a prole HF-F1 (P=0.009) e HF-F2 apresentaram hiperinsulinemia (P=0.03). Em relação, a esteatose hepática esta foi maior na prole HF-F1 em torno de 18% mais gotículas lipídicas depositadas no fígado, do que na prole SC-F1 (P<0.0001), enquanto a prole HF-F2 apresentou aumento de 13% neste parâmetro quando comparado a prole SC-F2 (P<0.0001). Em relação à expressão de proteínas, a prole HF-F1 apresentou expressão significativamente maior do PPAR-gama e SREBP-1c, ambos fatores de transcrição lipogênicos, em comparação a prole SC-F1 (P=0.01). A prole HF-F2 mostrou apenas expressão significativamente maior do PPAR-gama quando comparado a SC-F2 (P=0.04). De modo interessante, a obesidade materna foi prejudicial para as vias lipogênicas e beta-oxidação através da regulação positiva do PPAR-gama e regulação negativa do PPAR-alfa. Por outro lado, a segunda geração demonstrou lipogênese elevada, por conta de um desequilíbrio do PPAR, favorecendo o acúmulo hepático de triglicerídeos com prejuízo no metabolismo da prole, mesmo não sendo exposta diretamente à dieta hiperlipídica.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica. Intergeracional. Programação metabólica.

ABSTRACT

LANNES, Wilian Rodrigues. *Maternal obesity increases lipogenesis and nonalcoholic fatty liver disease in the offspring until the F2 generation.* 4 9 f , 2015 Dissertação (Mestrado em Ciências, Biologia Humana e Experimental) – Instituto de Biologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 2015.

Diet-induced maternal obesity may program susceptibility in offspring to chronic diseases and affect subsequent generations. The present study evaluated the effects of maternal obesity upon liver structure in early adult life, focusing on the F1 and F2 generations. C57BL/6 female mice (F0) were fed standard chow (SC) or HF diet (8 weeks) prior to mating and during the gestation and lactation to provide the F1 generation (F1-SC and F1-HF). At 3 months old, F1 females were mated to produce the F2 generation (F2-SC and F2-HF). The liver was dissected, weighed and sliced into several fragments at 5 µm thickness and stained with hematoxylin and eosin. Frozen liver tissue was used to analyze western blot and triacylglycerol. Data were analyzed by unpaired Student's *t*-test. The HF-F1 group had higher body mass (BM) at 90 days when compared with SC-F1 (P=0.001), whereas the HF-F2 offspring showed no significant difference in BM when compared to SC-F2 offspring. HF-F1 had glucose intolerance when compared to SC-F1 group. This result was not observed in the F2 offspring. Nevertheless, HF-F1 offspring (P=0.009) and the HF-F2 showed hyperinsulinemia (P=0.03). Regarding the hepatic steatosis, the HF-F1 offspring presented 18% more lipid droplets than SC-F1 offspring (P<0.0001), while the HF-F2 showed a 13% increase in this parameter when compared to SC-F2 offspring (P<0.0001). The HF-F1 offspring showed increased expression of PPAR-gamma and SREBP1- c, lipogenic transcription factors, when compared to SC-F1 offspring (P=0.01). The HF-F2 offspring showed only increased PPAR-gamma expression when compared to SC-F2 offspring (P=0.04). Interestingly, maternal obesity impairs both lipogenesis and beta-oxidation pathways through upregulation of PPAR- gamma and downregulation of PPAR-alpha. Conversely, the second-generation offspring presented with only enhanced lipogenesis, but it causes disrupted PPAR balance, favoring hepatic lipid accumulation and impaired metabolism in these animals that were not directly exposed to the HF intake.

Keywords: Fat diet . Intergenerational . Metabolic programming.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Evolução da doença hepática gordurosa não alcóolica.....	20
Figura 2 –	Modificações epigenéticas passadas a várias gerações subsequentes.....	22
Tabela 1 –	Composição das dietas experimentais.....	25
Figura 3 –	Desenho experimental, ilustrando a formação das proles F1 e F2, a partir da matriz F0.....	26
Figura 4 –	Imagem digital de corte histológico do fígado.....	29
Figura 5 –	Massa corporal das progenitoras no período pré-gestacional, após 8 semanas de dieta hiperlipídica ou padrão.....	31
Figura 6 –	Teste oral de tolerância à glicose, representado pela avaliação da área sob a curva das progenitoras no período pré-gestacional, após 8 semanas de dieta hiperlipídica ou padrão.....	32
Figura 7 –	Massa corporal da prole da primeira (F1) e segunda gerações (F2) aos 3 meses de idade.....	33
Figura 8 –	Teste oral de tolerância à glicose da primeira (F1) e segunda gerações (F2).....	34
Tabela 2 –	Parâmetros bioquímicos e hepáticos da prole da primeira e segunda gerações aos 3 meses de idade	35
Figura 9 –	Fotomicrografias da Esteatose hepática (coloração por H&E, mesmo aumento em todas as fotos) e quantificação da esteatose hepatica.....	36
Figura 10 –	*Western blot* da expressão de PPAR-gama, SREBP-1c, PPAR-alfa no fígado por beta-actina (média e desvio padrão da media).....	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIN-93 –	American Institute of Nutrition Câncer de Mama
ALT –	Alanina Aminotransferase
CPT1 –	Carnitina, Palmitoil Transferase
DHGNA –	Doença Hepática Gordurosa Não Alcóolica
DNA –	Ácido Desoxirribonucléico
FO –	Progenitoras
F1 –	Primeira geração da prole
F2 –	Segunda geração da prole
HF –	Dieta Hiperlipídica (high fat)
IMC –	Índice de Massa Corporal
MC –	Massa Corporal
PPAR –	Receptor Ativado Por Proliferadores Peroxissomais
RNA –	Ácido Ribonucléico
SC –	Dieta Padrão para Roedores (standard chow)
TOTG –	Teste Oral de Tolerância à Glicose
SREBP-1C –	Proteína De Ligação De Regulação Do Esterol,1c
SIRT1 –	Sirtuina, proteina de transmissão da (DHGNA), regula a transmissão dos PPARs

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	13
1	**REVISÃO DE LITERATURA**.....	15
1.1	**Obesidade materna**.....	15
1.2	**Programação metabólica**.....	16
1.3	**Esteatose hepática e programação metabólica**.....	17
1.4	**Mecanismos epigenéticos**.....	20
2	**OBJETIVOS**.....	23
2.1	**Objetivo geral**.....	23
2.2	**Objetvos específicos**.....	23
3	**MATERIAIS E MÉTODOS**.....	24
3.1	**Animais e dieta**.....	24
3.2	**Massa corporal**.....	27
3.3	**Teste oral de tolerância à glicose.**.....	27
3.4	**Eutanásia dos animais**.....	27
3.5	**Determinação das concentrações de lipídios plasmáticos.**.....	28
3.6	**Determinação da concentração de insulina**.....	28
3.7	**Análise do Fígado**.....	28
3.7.1	Estrutura.....	28
3.7.2	Bioquímica.....	29
3.7.3	Western Blot.....	30
3.8	**Análise Estatística**.....	30
4	**RESULTADOS.**.....	31
4.1	**Progenitoras**.....	31
4.1.1	Massa corpora.....	31
4.1.2	Teste oral de tolerância à glicose – TOTG.....	32
4.2	**Prole**.....	33
4.2.1	A dieta materna altera a massa corporal da prole F1, mas não da F2.....	33
4.2.2	Dieta hiperlipídica materna altera o metabolismo de carboidratos diferentemente em ambas gerações.....	34
4.2.3	Dieta materna hiperlipídica altera lipídios plasmáticos apenas na primeira	

geração..... 35
4.2.4 Dieta materna favorece a via da lipogênese e aumenta a esteatose hepática em ambas as gerações..... 35
5 **DISCUSSÃO**..... 38
CONCLUSÃO..... 41
REFERÊNCIAS..... 42
ANEXO A – Comitê de Ética em Pesquisa..... 48
ANEXO B – Termo de Submissão à Revista International Journal of Morphology..... 49

INTRODUÇÃO

A nutrição materna é importante e, quando inadequada, pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças crônicas no adulto. Alteração na nutrição materna, incluindo desnutrição e superalimentação, pode levar a distúrbios metabólicos na descendência, o que corresponde à "programação" de doenças crônicas na vida adulta (Aaltonen *et al.*, 2011; Alfaradhi e Ozanne, 2011).

Nos últimos anos o número de evidências é crescente envolvendo a superalimentação materna nos períodos pré-gestacional, gestação e lactação com a alteração de vias metabólicas na prole (Alfaradhi *et al.*, 2014; Ornellas *et al.*, 2015). A obesidade materna favorece o aparecimento precoce de obesidade e suas comorbidades na prole, mesmo quando há uma nutrição adequada na vida pós- desmame (Gregorio *et al.*, 2010).

Existe uma situação preocupante de transmissão cíclica, transgeracional, da obesidade devido ao aumento do número de mulheres com sobrepeso/obesidade em idade fértil (Alfaradhi *et al.*, 2014). O desenvolvimento da obesidade frequentemente resulta no aparecimento de outras complicações metabólicas, incluindo a resistência à insulina e doenças cardiovasculares que, em conjunto, corresponde a síndrome metabólica (Aballay *et al.*, 2013).

Há evidências substanciais, em seres humanos e em modelos experimentais, demonstrando que a modulação da dieta materna, seja através da restrição energética (Frantz *et al.*, 2011), ou através da ingestão de dieta com alto teor de gordura predispõe à obesidade e síndrome metabólica na descendência de primeira geração (F1) (Guo e Jen, 1995). Estudos recentes indicam que animais F1 podem transmitir fenótipos semelhantes à segunda geração (F2) e até mesmo para a terceira geração (F3) (Benyshek *et al.*, 2006; Pinheiro *et al.*, 2008).

A superalimentação ou excesso de nutrientes durante o desenvolvimento sugere que a obesidade materna predispõe a prole à obesidade e disfunção metabólica na idade adulta (Catalano, 2003; Oken e Gillman, 2003), causando a esteatose hepática ou "doença hepática gordurosa não alcoólica" (DHGNA), considerada a doença hepática mais comum no ocidente, com prevalência aproximada de 30% na população dos Estados Unidos (Lazo e Clark, 2008).

A esteatose hepática também está associada com a resistência à insulina, que é central para a sua patogênese (Marchesini *et al.*, 2001). A hiperinsulinemia parece mediar esse desvio metabólico, pois é capaz de transpor a placenta. Assim, o fígado, que é órgão central do

metabolismo, torna-se alvo para acúmulo de lipídeos durante a vida intrauterina (Cerf, 2007; Yessoufou e Moutairou, 2011).

A resistência à insulina desempenha papel central na gênese da esteatose hepática, uma vez que a insulina estimula a lipólise no tecido adiposo branco, aumentando assim a entrada de ácidos graxos livres no fígado e prejudicando a beta-oxidação hepática (Koteish e Diehl, 2001; Angulo, 2007; Aguila *et al.*, 2010).

Os PPARs (*peroxisome proliferator-activated receptors* - receptores ativados por proliferador de peroxissoma) são fatores responsáveis pela transcrição de genes envolvidos com a beta-oxidação e lipogênese no fígado. Já está descrito que uma dieta materna hiperlipídica desencadeia um desequilíbrio nos PPARs na prole na primeira geração, favorecendo a expressão elevada de PPAR-gama (fator de lipogênese) concomitante à diminuição da expressão de PPAR-alfa, que é essencial para a beta-oxidação mitocondrial (Magliano *et al.*, 2013).

Danos hepáticos têm sido descritos tanto em camundongos recém-nascidos, quanto em camundongos adultos de primeira geração (Alfaradhi *et al.*, 2014). Entretanto, pouca atenção é dada a um possível efeito intergeracional causado pela dieta materna hiperlipídica que altera a estrutura e função hepática.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 **Obesidade materna**

Diante do crescente aumento da obesidade, e consequentemente obesidade materna e diabetes gestacional, estudos recentes têm-se centrado sobre os potenciais efeitos negativos da superalimentação fetal. Estes revelaram uma relação entre a obesidade materna e o início da síndrome metabólica na prole. Muitos estudos epidemiológicos têm mostrado uma associação entre IMC materno e diabetes gestacional com adiposidade da prole (Shankar *et al.*, 2008; Locke *et al.*, 2015).

Uma possível explicação para a maior incidência de sobrepeso e obesidade nos filhos expostos ao diabetes materno e obesidade é que estas mulheres transmitem um maior número de genes de susceptibilidade aos seus descendentes em comparação com mulheres de peso normal. O ganho de peso materno e aumento do IMC entre as gestações também é descrito capaz de aumentar o risco do excesso de peso na prole em comparação a prole de mães que não engordaram durante a gestação (Adamo *et al.*, 2013; Cachelin, 2013).

Além disso, foi observado em filhos de mulheres obesas que nasceram após a cirurgia bariátrica uma redução no risco de obesidade e outros efeitos adversos na prole em comparação com os irmãos que nasceram antes da cirurgia da mãe (Kral *et al.*, 2006). Estes dados mostram um risco desproporcional na prole da mesma mãe sob diferentes condições no útero e reforça o conceito de que as condições ambientais, tanto em adição e independente de susceptibilidades genéticas, são capazes de criar fisiologicamente a programação durante o desenvolvimento (Kral *et al.*, 2006; Alfaradhi e Ozanne, 2011).

Estes resultados são relevantes, pois as taxas de sobrepeso e obesidade em mulheres em idade fértil continuam a aumentar em todo o mundo. Nos EUA, a prevalência de mulheres obesas com idades entre 20-39 anos triplicou entre 1960 e 2000 (Alfaradhi e Ozanne, 2011). Isso apresenta um quadro preocupante de transmissão transgeracional cíclica da obesidade. Outros estudos mostraram queo peso ao nascer e a macrossomia tem uma maior associação com os níveis maternos de triglicerídeos do que com a intolerância à glicose materna (Di Cianni *et al.*, 2005), sugerindo que componentes da dieta podem influenciar o desenvolvimento do feto durante a gravidez. A importância do elevado teor de gordura na dieta podendo alterar a prole também foi estabelecida em primatas não

humanos. O consumo de dieta hiperlipídica materna (35% de gordura) durante a gravidez levou a aumentos significativos nos níveis de ácidos graxos livres no feto, o que pode levar à resistência à insulina (McCurdy *et al.*, 2009).

Além disso, a gordura dietética presente na dieta hiperlipídica desempenha um papel *per se* em influenciar o fenótipo da prole independentemente da resistência à insulina através da influência do peso corporal da prole e o conteúdo de triglicérides no fígado. No entanto, a combinação de dieta hiperlipídica e resistência à insulina na mãe tem efeitos adicionais sobre a adiposidade no início da vida da prole (Carmody *et al.*, 2011).

1.2 **Programação metabólica**

A origem fetal das doenças que aparecem no adulto é conhecida como "Teoria de Barker" segundo a qual, a nutrição deficiente durante a gestação e infância precoce dará origem a uma adaptação metabólica e/ou estrutural permanente que aumenta o risco de desenvolvimento de doenças na vida adulta (Barker, 1990, 1995, 2007).

Essa teoria deu origem ao conceito de programação metabólica, definida como a resposta a um desafio específico durante uma janela de tempo crítico do desenvolvimento com efeitos na saúde que persistem ao longo da vida (Bautista *et al.*, 2015). Esta teoria vai emprega o conceito de plasticidade do desenvolvimento, ou seja, a capacidade de um organismo adaptar a estrutura e função em resposta a exposições diferentes durante o desenvolvimento. Essa adaptação é possível apenas durante um período crítico do desenvolvimento, que para a maioria dos órgãos e sistemas, corresponde a vida intrauterina (Gluckman e Hanson, 2004). Há cada vez mais evidências de que mecanismos epigenéticos estão envolvidos nos processos de plasticidade do desenvolvimento e, consequentemente com a programação metabólica (Cutfield *et al.*, 2007).

Estudos em humanos (Roseboom *et al.*, 2000) e em modelos animais (Gregorio *et al.*, 2010; Graus-Nunes *et al.*, 2015) têm relatado que o ambiente nutricional adverso fetal e neonatal pode induzir obesidade e comorbidades na prole, podendo alcançar a segunda geração (Zambrano, 2009; Bringhenti *et al.*, 2015; Graus- Nunes *et al.*, 2015).

No desenvolvimento de mamíferos a disponibilidade de nutrientes é transferida ao embrião/feto através da placenta, e para o lactente durante o aleitamento. Assim, a programação é induzida por respostas adaptativas que o feto ou recém-nascido têm à

estímulos da mãe. Respostas fetais ou perinatais podem incluir mudanças no metabolismo, produção hormonal e sensibilidade dos tecidos aos hormônios que, por sua vez, pode afetar o desenvolvimento de vários órgãos, levando a alterações persistentes na homeostase metabólica (Gluckman e Hanson, 2004).

A nutrição desempenha um papel fundamental no desenvolvimento dos indivíduos, dessa forma, há evidências crescentes de que a obesidade materna é um fator de risco para a obesidade nos filhos. Tem sido relatado que 24% dos filhos de mães obesas são obesos aos 4 anos de idade, em comparação a 9% das crianças nascidas de mães com peso normal (Whitaker, 2004). Além disso, uma estreita relação entre ganho de peso materno durante a gestação e obesidade na infância tem sido relatada (Zambrano, 2009). Tem sido demonstrado que camundongos fêmea, alimentados com dieta hiperlipídica desde antes do acasalamento até o período de lactação, apresentaram aumento de peso e a sua prole desenvolve hiperfagia, adiposidade elevada, atividade locomotora reduzida, hipertensão arterial, resistência à insulina, demonstrando que a dieta materna induz o desenvolvimento da programação metabólica na prole (Samuelsson *et al.*, 2008).

O período pós-natal precoce também é um período que pode influenciar o desenvolvimento da prole. O período pós-natal é um período de desenvolvimento, e crescimento rápido e nele agem fatores associados ao aumento do risco de obesidade. Estudos prévios têm implicado que o rápido crescimento pós-natal da prole que foi gerada em um ambiente de desnutrição materna cursa com a obesidade no início na idade adulta (Chen *et al.*, 2010). O ganho de peso durante a infância está associado com a adiposidade, pressão arterial, os níveis de triglicerídeos e outros fatores de risco metabólico independentes do peso ao nascer (Ekelund *et al.*, 2007).

1.3 **Esteatose hepática e programação metabólica**

O fígado desempenha um papel central no metabolismo global, regulando uma variedade de reações bioquímicas. Já comentamos que a DHGNA é considerada a doença hepática mais comum no hemisfério ocidental (prevalente em cerca de 30% na população dos Estados Unidos) (Abd El-Kader e El-Den Ashmawy, 2015). O espectro da DHGNA se inicia com esteatose e pode evoluir até cirrose hepática e câncer (Karagozian *et al.*, 2014).

DHGNA é definida como o acúmulo excessivo de gordura no fígado superior a 10% do

órgão, conforme determinado a partir da porcentagem de hepatócitos contendo gotículas de gorduras visualizados por microscopia de luz (Aguila *et al.*, 2010). Atualmente a DHGNA é a manifestação hepática da síndrome metabólica, tendo a resistência à insulina como o principal mecanismo patogênico (Bugianesi *et al.*, 2005). É morbidade importante, que resiste mesmo nos indivíduos obesos que emagrecem (Barbosa-da-Silva *et al.*, 2012; Barbosa-da-Silva *et al.*, 2013).

A deposição de lipídios hepáticos é atribuída a desregulação da homeostase lipídica, que pode resultar do aumento da liberação de ácidos graxos a partir do tecido adiposo, aumento da síntese de ácidos graxos por meio da lipogênese *de novo* que reduz a oxidação mitocondrial, ou uma combinação destes fatores (Marchesini *et al.*, 2001). Recentemente, vem sendo demonstrado que a ingestão de gordura na dieta materna contribui para o desenvolvimento da DHGNA na prole adulta, através do metabolismo mitocondrial hepático e da regulação da lipogênese hepática (Oben *et al.*, 2010; Alfaradhi *et al.*, 2014; Bringhenti *et al.*, 2015). Estes são achados potencialmente significativos. O período de lactação pode exercer um efeito metabólico sobre o desenvolvimento da DHGNA e outras condições (de aumento de peso, marcadores bioquímicos) implicados no desenvolvimento do síndrome metabólica (Oben *et al.*, 2010).

Na obesidade materna, a unidade fetoplacentária se desenvolve sob condições de excesso de nutrientes e um ambiente com inflamação. A literatura demonstra que o consumo de dieta hiperlipídica durante a gravidez reduz o fluxo sanguíneo uterino, exacerba a inflamação da placenta e aumenta o risco de morte fetal (Frias *et al.*, 2011). No útero a dieta hiperlipídica altera o desenvolvimento metabólico normal dos órgãos no feto. Especificamente, fetos no terceiro trimestre de mães alimentadas com dieta hiperlipídica apresentam esteatose, aumento do estresse oxidativo hepático e apoptose celular (McCurdy *et al.*, 2009). Na grande maioria dos casos, a DHGNA infantil e adulta se desenvolve na presença da resistência à insulina e consequentemente síndrome metabólica. Os dados em humanos demonstraram que a redução da sensibilidade à insulina em todo o corpo está presente ao nascimento em filhos de mães obesas e com resistência à insulina (Catalano *et al.*, 2009). Sugere-se que a esteatose hepática fetal tenha o fenótipo em grande parte explicado pelo aumento da transferência de energia transplacentária (McCurdy *et al.*, 2009).

Alguns estudos concluem que o acúmulo de gordura hepática no início da vida não é simplesmente uma manifestação precoce da DHGNA, mas um evento fisiopatológico independente que, em seguida, potencializa a doença hepática pós- natal. Favorável a esta ideia, estudos demonstraram que a exposição a dieta hiperlipídica *in utero* parece piorar o

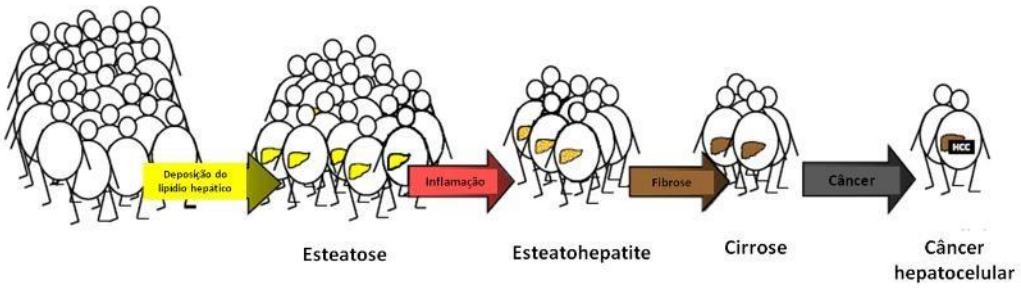
fenótipo da DHGNA na prole de camundongos adultos exposta a um estilo ocidental de dieta hiperlipídica até o desmame. Nesses animais, expostos a dieta hiperlipídica materna, mesmo sendo submetidos a dieta controle após o desmame a DHGNA não foi revertida completamente (Bruce *et al.*, 2009).

A persistência da esteatose hepática na vida pós-natal pode resultar de alterações em algum dos seguintes processos hepáticos: lipogênese *de novo*, oxidação dos ácidos graxos, ou exportação de lipoproteínas. A proteína de ligação do elemento de regulação do esterol 1c (SREBP-1c), é um fator de transcrição regulado pela insulina, que é o principal controlador da lipogênese hepática *de novo*. O SREBP- 1c é regulado positivamente no fígado da prole de camundongos adultos e jovens previamente expostos a dieta hiperlipídica materna (Bruce *et al.*, 2009; Gregorio *et al.*, 2010). Estudos demonstraram uma redução da oxidação de ácidos graxos em camundongos adultos que foram expostos a dieta hiperlipídica materna. Quando a prole foi exposta a dieta hiperlipídica pós-desmame, os camundongos adultos foram incapazes de aumentar a β-oxidação mitocondrial, com consequente redução na oxidação dos ácidos graxos e consequente depósito observado como esteatose hepática (Bruce *et al.*, 2009).

A expressão hepática de carnitina palmitoil transferase (CPT), uma enzima chave que media o transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a oxidação na mitocôndria, não é aumentada em fígados com esteatose de camundongos adultos que foram expostos a superalimentação gestacional (Bayol *et al.*, 2010). Todas essas vias culminam na disfunção mitocondrial que resulta na redução da oxidação dos ácidos graxos e esteatose hepática (Borengasser *et al.*, 2011).

Outra proteína que ajuda na compreensão da transmissão intergeracional da DHGNA é a Sirtuina-1 (SIRT1), enzima que controla uma ampla gama de genes de importância metabólica. A SIRT1 regula a transcrição dos receptores ativados por PPAR-alfa e PPAR-gama, que controlam a oxidação e a lipogênese, respectivamente. Os lipídios e intermediários lipídicos são os ligantes naturais para o PPAR-alfa, o que resulta em aumento da transcrição do PPAR-alfa promovendo a oxidação dos ácidos graxos, no entanto esta ativação parece estar prejudicada em indivíduos com esteatose hepática.

Figura 1 - Evolução da doença hepática gordurosa não alcóolica



Legenda: A figura apresenta a evolução da esteatose hepática onde 20% dos casos evolui para esteatohepatite que em aproximadamente 15% dos casos evolui para cirrose e por sua vez em alguns casos evolui para câncer hepatocelular.
Fonte: Adaptado de Peter Dietrich (Dietrich e Hellerbrand, 2014).

1.4 **Mecanismos epigenéticos**

Recentemente, viu-se que a programação de doenças crônicas por alteração nutricional na mãe pode ultrapassar a primeira geração e atingir as gerações subsequentes, conhecido como transmissão transgeracional (Zambrano *et al.*, 2005; Frantz *et al.*, 2011; Nascimento *et al.*, 2012). A sensibilidade ambiental dos epigenomas é visto como um mecanismo adaptativo em que o desenvolvimento do organismo ajusta seus sistemas metabólico e homeostático para se adequar ao ambiente extrauterino (Hanson *et al.*, 2011). O ambiente de desenvolvimento induz fenótipos alterados através de mecanismos genéticos, fisiológicos (especialmente endócrino) e epigenéticos (McLachlan, 2001). Marcas epigenéticas podem ser reprogramadas em resposta a estímulos ambientais, tais como mudanças na dieta e no ambiente uterino. Estes traços epigenéticos podem se espalhar rapidamente, resultando em uma manifestação de um fenótipo ao longo de várias gerações. A transmissão transgeracional pode exacerbar o rápido início dos fenótipos, tais como aumento da altura, obesidade ou diabetes em populações humanas no último século (James, 2008; Bruce e Hanson, 2010).

Os três principais mecanismos moleculares envolvidos nos processos epigenéticos são o DNA, as histonas, que são as proteínas que formam o núcleo em torno do qual o DNA envolve e uma forma específica de moléculas de RNA (RNA não codificante). Sendo assim, as alterações epigenéticas incluem metilação do DNA, as modificações covalentes das histonas e RNAs não-codificantes (Dolinoy e Jirtle, 2008). A associação entre o crescimento

fetal e doenças na fase adulta implica, em alterações na expressão de genes que é regulada por mecanismos epigenéticos que os ativam ou desativam através da modulação da transcrição do DNA. A metilação do DNA origina inativação dos genes enquanto a acetilação das histonas promove a transcrição. Nos últimos anos temos visto um aumento na investigação sobre mecanismos epigenéticos envolvidos nas doenças. A metilação do DNA é o mecanismo mais estudado (Alfaradhi e Ozanne, 2011).

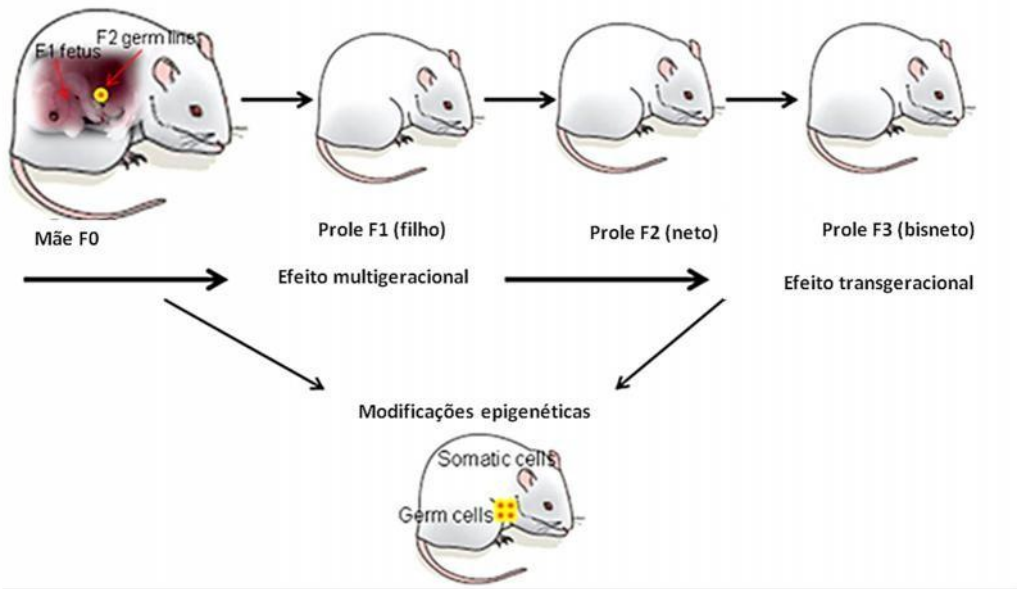
Evidências demonstraram, em estudos humanos e animais, que mecanismos epigenéticos são os potenciais mediadores da obesidade. Fatores nutricionais e ambientais podem interagir com o genótipo modulando marcações epigenéticas nas células somáticas e influenciando assim o fenótipo. Dessa forma, esses padrões de metilação podem ser transmitidos através das gerações (Cropley *et al.*, 2006). A elucidação de processos epigenéticos pode permitir a identificação perinatal dos indivíduos com maior risco de desenvolver a síndrome metabólica tardia e possibilitar estratégias de intervenção precoce para reduzir tais riscos.

Os genes que regulam a adipogênese, a homeostase da glicose, a inflamação e/ou a sinalização de insulina são regulados por mecanismos epigenéticos, incluindo, receptores nucleares (PPARs) e enzimas que atuam na gliconeogênese (Desai *et al.*, 2015). Há também evidências que as exposições ambientais durante a infância podem induzir alterações persistentes no epigenoma da prole, o que pode levar a um aumento do risco de obesidade e síndrome metabólica na vida adulta. Nos humanos a programação da obesidade ocorre principalmente através de alterações na metilação do DNA, o envolvimento da modificação de histonas e alterações na estrutura da cromatina ainda não foram demonstrados (Desai *et al.*, 2015). Estudos em animais demonstraram que tanto a metilação do DNA e alterações na modificação da histona estão associadas com a programação da obesidade materna através da superalimentação em modelos de roedores (Campion *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012). As alterações ambientais têm sido detectadas em genes que regulam fatores de crescimento, adipogênese, e homeostase da glicose (Tosh *et al.*, 2010).

Para entender como marcas epigenéticas se tornam hereditárias é importante estudar a metilação do DNA, que é altamente dinâmica durante a embriogênese. Entretanto, ao contrário da crença popular, a metilação do DNA não se completa completamente durante o desenvolvimento inicial ou gametogênese (Trasler, 2009). Dessa forma, algumas regiões metiladas sobrevivem e são replicadas cada vez que a célula se divide e o DNA é passado associado com histonas. Essas marcações podem, então, ser copiadas cada vez que a célula se divide, influenciando a expressão do gene ao longo da vida (Guibert *et al.*, 2012). Assim,

modificações epigenéticas fornecem um mecanismo pelo qual as exposições ambientais e nutricionais precoces afetam o fenótipo da prole através da modificação da linha germinativa (Barres e Zierath, 2011).

Figura 2 - M odificações epigenéticas passadas a várias gerações subsequentes



Legenda: Exposições ambientais e herança epigenética transgeracional. A herança transgeracional deve estender-se a partir da F0 até a geração F3.

Fonte: Adaptado de Desai e colaboradores (Desai *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

2.1 **Objetivo geral:**

O presente estudo tem como objetivo verificar se a obesidade materna no período pré-gestacional e perinatal, além de "programar" os animais da primeira geração, persistem na segunda geração, enfocando a análise das principais vias metabólicas relacionadas com a DHGNA. Deste modo, desejamos induzir a obesidade materna por oferta de dieta hiperlipídica e avaliar seus efeitos no fígado da prole das duas gerações seguintes (F1 e F2).

2.2 **Objetivos específicos:**

Avaliar os seguintes parâmetros na prole:

a) Massa corporal e metabolismo de carboidratos,
b) Perfil lipídico (colesterol total, triacilglicerol),
c) Alterações funcionais e remodelamento estrutural hepático,
d) Beta-oxidação e lipogênese.

3 **MATERIAIS E MÉTODOS**

3.1 **Animais e dieta**

Os procedimentos experimentais deste trabalho seguiram as normas estabelecidas no guia 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 CEUA/017/2013, no Anexo).

Camundongos da linhagem C57BL/6 foram cuidados no biotério do Laboratório de Morfometria, Metabolismo e Doença Cardiovascular (LMMC), em estantes ventiladas Neogen Allentown, mantidos em condições controladas de temperatura (21±2ºC) e umidade (60±10%), com livre acesso à comida e água. O ambiente foi submetido a ciclos de 12/12horas claro-escuro e de renovação de ar. Fêmeas virgens (F0) com quatro semanas de idade foram separadas aleatoriamente em um dos dois grupos nutricionais (n=10):

a) grupo *Standard Chow* (SC), com 17% da energia proveniente de lipídios;

b) grupo *High Fat* (HF) com 49% da energia proveniente de lipídios.

Os animais do grupo SC receberam dieta própria para roedores para a fase de gestação/lactação normoproteica (190g proteína/Kg dieta) e normolipídica (70g lipídeos/Kg dieta). O grupo HF recebeu dieta contendo alto teor de lipídios (270g lipídeos/Kg dieta), com o mesmo percentual energético proveniente das proteínas como o da dieta SC.

É relevante destacar que o incremento do percentual lipídico da dieta HF foi compensado pela redução de hidratos de carbono. O aporte de vitaminas e minerais foi semelhante nas duas dietas, seguindo as normas preconizadas para roedores do *American Institute of Nutrition* (AIN-93G) (Reeves *et al.*, 1993).

As dietas experimentais foram confeccionadas pela empresa Pragsoluções (Jau, SP, Brasil) e suas composições nutricionais encontram-se demonstradas na Tabela 1. Diariamente as dietas foram ofertadas aos animais e, caso houvesse sobras, elas eram desprezadas a fim de evitar oxidação lipídica. A rotina de avaliação do consumo e dos restos das dietas foi mantida durante todo o período experimental.

Tabela 1 – Composição das dietas experimentais

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	1000,0	1000,0
Energia (Kcal/Kg)	4950,0	3950,0
Hidratos de carbono (%)	32	64
Proteínas (%)	19	19
Lipídios (%)	49	17

Após oito semanas de dieta, e com 12 semanas de idade, as fêmeas F0 foram acasaladas com machos da mesma idade que receberam durante toda a vida dieta SC. É importante ressaltar que as dietas do período pré-gestacional foram mantidas durante a gestação e a lactação nas progenitoras F0. Ao desmame as proles (machos e fêmeas) da F1 e F2 passaram a receber dieta SC ao longo de todo experimento.

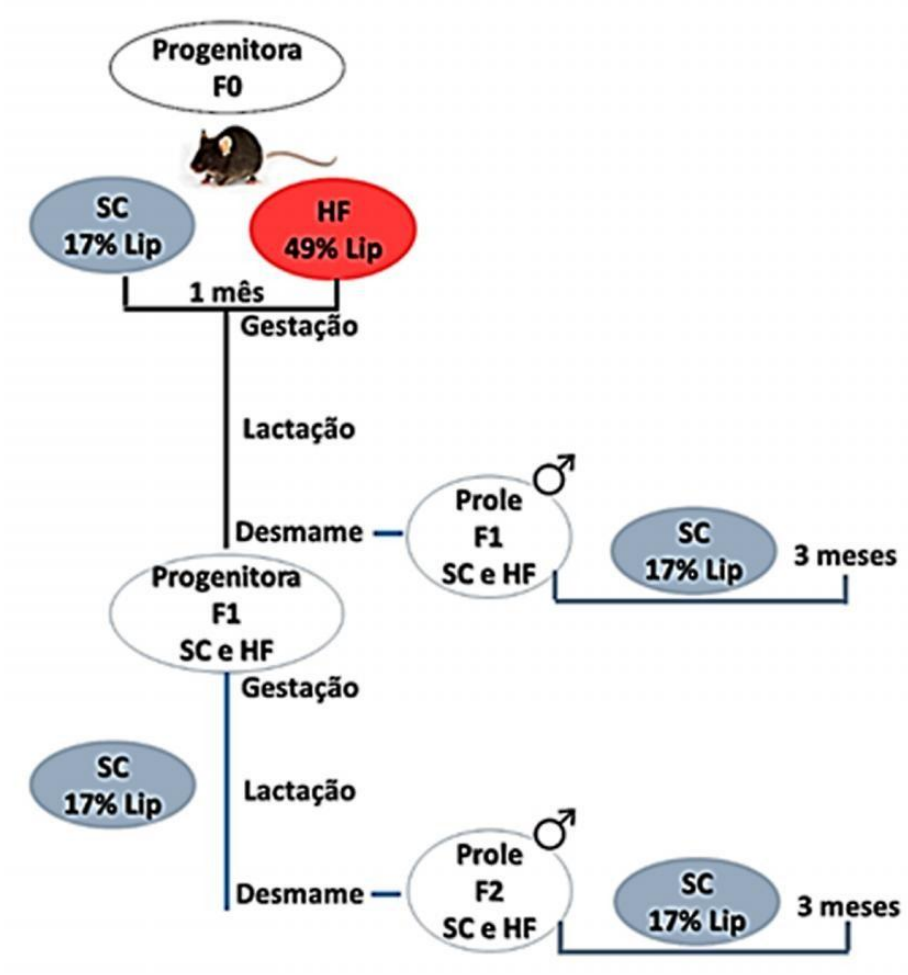
Ao nascimento, o gênero dos filhotes foi identificado pelo método da distância anogenital (Vandenbergh e Huggett, 1995). Após esse procedimento, a ninhada de cada progenitora foi fixada em seis filhotes (três machos e três fêmeas), a fim de padronizar a nutrição da prole durante a lactação. Ao desmame (21 dias), os filhotes machos da primeira geração (F1), SC e HF, compuseram a prole F1, enquanto as fêmeas SC e HF foram aleatoriamente selecionadas, dentro de cada grupo, e assim alimentadas com dieta SC, segundo a AIN93G, para gerar a prole da segunda geração (F2).

Aos três meses de idade, fêmeas F1 foram acasaladas com machos da mesma

idade, e alimentados com dieta SC por toda a vida a fim de originar F2. Os mesmos padrões, utilizados na separação e obtenção da prole F1, foram realizados com a geração F2. As proles de machos (F1 e F2) foram acompanhadas até os três meses de idade, além disso, é importante acrescentar, que somente um filhote de cada progenitora foi utilizado para a formação dos grupos experimentais e que nunca mais de um filhote da mesma ninhada compôs o mesmo grupo. Desta forma, os grupos experimentais estudados seguiram da seguinte forma:

- Primeira geração: F1-SC e F1-HF
- Segunda geração: F2-SC e F2-HF

Figura 3 - Desenho experimental, ilustrando a formação das proles F1 e F2, a partir da matriz F0



Legenda: F0=Progenitoras do estudo que 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 (F1 e F2) receberam após o desmame apenas dieta padrão para roedores até o terceiro mês de vida, quando ocorreu a eutanásia.

Fonte: O autor, 2015

3.2 **Massa corporal**

Durante o período pré-gestacional e durante a gestação, a massa corporal (MC) das progenitoras foi mensurada semanalmente em balança digital de precisão. Da mesma forma, a MC das proles foram acompanhadas semanalmente até a eutanásia.

3.3 **Teste oral de tolerância à glicose**

O teste oral de tolerância à glicose (TOTG) foi realizado nas progenitoras duas semanas antes do acasalamento e nas proles na semana anterior à eutanásia, após jejum de seis horas. Os animais foram gavados com solução de glicose 25% (1,0g/Kg) por cânula orogástrica. Passados 15, 30, 60 e 120 minutos, a cauda dos animais foi ordenhada para obtenção de novas amostras de sangue para aferição dos valores glicêmicos (glicosímetro Accu-chek performa, Roche, Manheim, Alemanha). Os resultados se basearam na área sob a curva (AUC) da variação da glicemia, de zero à 120 minutos (Prism v.6.05 para Windows, GraphPad Software, São Diego, Estados Unidos da América).

3.4 **Eutanásia dos animais**

Na véspera do dia da eutanásia, os animais ficaram em jejum por seis horas (1 hora da manhã às 7horas da manhã). Antes do procedimento, os animais foram anestesiados profundamente (pentobarbital sódico, 150 mg/kg) sangue foi coletado por punção cardíaca e foi armazenado para posterior análise. O fígado foi retirado, pesado, fragmentado e estudado conforme a descrição mais adiante.

3.5 **Determinação das concentrações de lipídios plasmáticos**

Os valores plasmáticos de colesterol total e triglicerídeos foram determinados utilizando um método colorimétrico cinético de acordo com as instruções do fabricante (Sistema de BIOCLIN II; Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil).

3.6 **Determinação da concentração de insulina**

Concentrações de insulina foram medidas usando kit de ensaio imunoenzimático (insulina Cat. Kit #EZRMI-13K, Millipore, Missouri, EUA) com o equipamento Termoplate (TP-READER ELX800, BiotekInstruments, USA).

3.7 **Análise do Fígado**

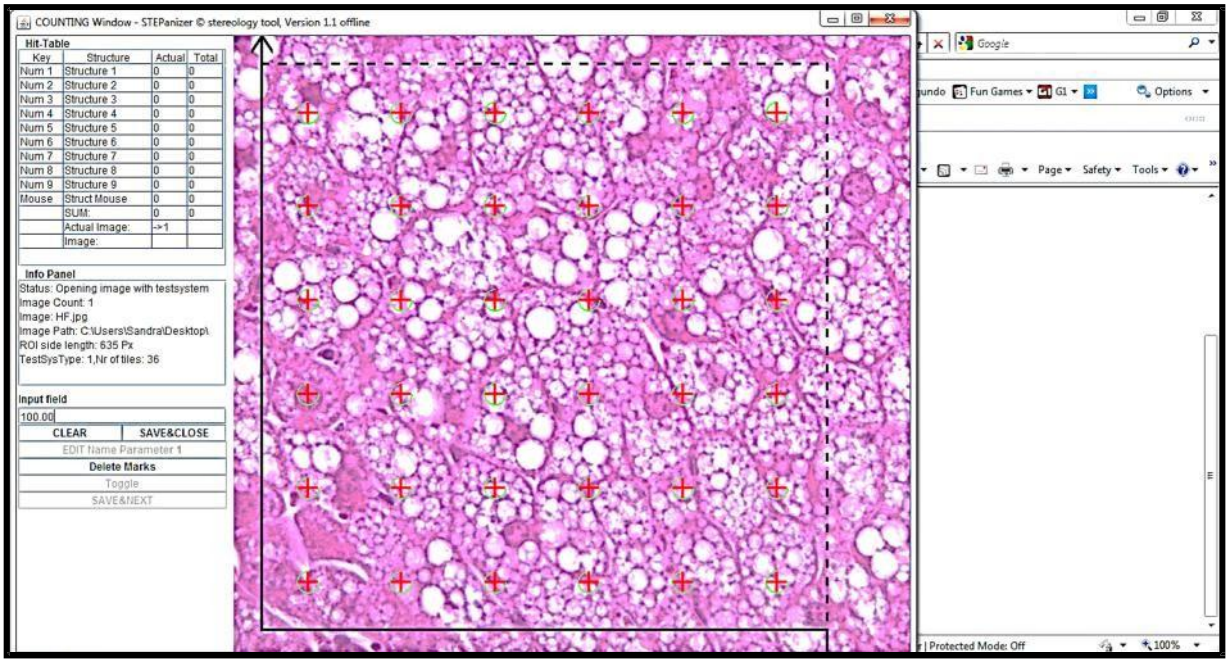
3.7.1 Estrutura

Fragmentos aleatórios do fígado foram mantidos em fixador recentemente preparado (formaldeído a 4% w/v, tampão fosfato 0,1 M pH 7,2) por 48h, em temperatura ambiente. Depois os fragmentos foram incluídos em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, Mo, EUA), seccionados com espessura de cinco micrômetros e lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina ou usadas para imunohistoquímica conforme detalhado mais adiante.
Fotomicrografias digitais foram obtidas em microscópio BX51 (Olympus Co, Tóquio, Japão) com câmera Infinity 1-5c (Lumenera Co, Ottawa, Canadá, formato JPEG, 24 bits e resolução de 2592 x 1944 pixels). Cinco animais por grupo e dez imagens aleatórias por animal foram analisadas, totalizando 50 imagens por grupo. As análises contaram com o sistema-teste de 36 pontos-teste (PT) produzido pelo programa Stepanizer (www.stepanizer.com). Os pontos-teste (PP) são contados quando estão sobrepostos às gotículas de gordura nos hepatócitos (Aguila *et al.*, 2003; Catta-Preta *et al.*, 2011). Assim, a densidade de volume da esteatose

(Vv[esteatose]) se determina como:

$$Vv\ estestose\ = \frac{\Sigma P_P}{P_T}$$

Figura 4 – Imagem digital de corte histológico do fígado



Legenda: Imagem do sistema-teste de 36 pontos sobreposto à imagem utilizando o software STEPanizer (www.stepanizer.com). Os pontos-teste foram produzidos na cor vermelha para se diferenciar da coloração por hematoxilina e eosina.

Fonte: O autor, 2015

3.7.2 Bioquímica

Amostras de fígado congeladas (50 mg) foram colocadas em um processador de ultrassom (modelo LB-130 PB,Labormetric, Miami, FL, EUA) com 1 ml de isopropanol e o homogeneizado foi centrifugado a 2000 G. Depois, 5 uL do sobrenadante foi analisado com analisador automático (K55,BIOCLIN Sistema II; Quibasa, Belo Horizonte, MG, Brasil), utilizando um kit para medir triglicerídeo. Além disso, a enzima alanina aminotransferase (ALT), foi avaliada no plasma, utilizando um método colorimétrico cinético (BIOCLIN Sistema II; Quibasa, Belo Horizonte,MG, Brasil).

3.7.3 Western Blot

Inicialmente, 100 mg de fígado congelado foi homogeneizado em tampão contendo inibidores de protease. Os homogenados foram centrifugados a 4^0 C, os sobrenadantes foram recolhidos e a proteína total foi determinada utilizando um kit de ensaio de proteína BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). Quantidades iguais de proteína total foram separadas usando a eletroforese em gel de poliacrilamida. A membrana foi bloqueada por incubação em 5% (peso/volume) de leite desnatado em solução salina tamponada com Tris (20 mmol/L de Tris/HCl pH 7,4 e 500 mmol/L NaCl). Incubou-se durante a noite a 4^0 C com os seguintes anticorpos primários:

a) para a lipogênese hepática (SREBP1-c 68kDa; SC-367) e PPAR-gama 67kDa, SC-7273);
b) para beta-oxidação hepática (PPAR-alfa 55 kDa, SC-9000);
c) as membranas também foram incubadas com anti-beta-actina (anticorpo monoclonal; 43 kDa; SC-81178; 1: 1000).

Todos os anticorpos foram adquiridos a partir de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, EUA). Após a incubação, as membranas foram lavadas com TTBS e incubados com anticorpo secundário por 1h à temperatura ambiente, com agitação constante. Para a detecção das imagens foi utilizado o reagente ECL e as imagens foram obtidas pelo Bio-Rad Image CEHmiDoc XRS Molecular System (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas de quimiluminescência foi quantificada utilizando o software ImageJ (versão 1.48, NIH imagej.nih.gov/ij, EUA).

3.8 **Análise estatística**

Os dados foram analisados para distribuição normal e homogeneidade das variâncias. As diferenças entre os grupos foram testadas com o teste *t* não pareado, a menos que indicado outro teste no texto (Prism v.6.05 para Windows, GraphPad Software, São Diego, Estados Unidos da América).

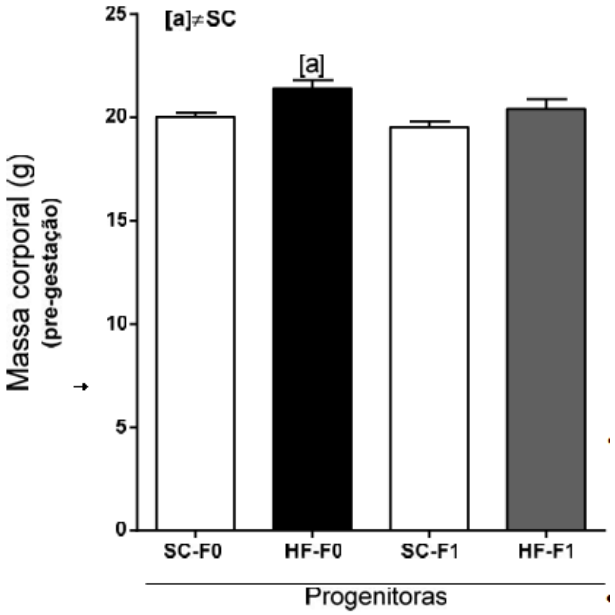
4 RESULTADOS

4.1 Progenitoras

4.1.1 Massa corporal

As progenitoras iniciaram o experimento sem apresentar diferença significativa na massa corporal. Durante o período de pré-acasalamento (primeiras oito semanas de experimento), as progenitoras que receberam dieta hiperlipídica, HF-0, apresentaram aumento significativo da massa corporal (+ 6%) quando comparado com o grupo SC-0 (P=0,01). No entanto, as progenitoras da geração HF-F1, utilizados para dar origem a prole HF-F2, não apresentaram diferença significativa na massa corporal no período pré-acasalamento em comparação com as progenitoras SC-F1 (P=0,12), figura 5.

Figura 5 - Massa corporal das progenitoras no período pré-gestacional, após 8 semanas de dieta hiperlipídica ou padrão



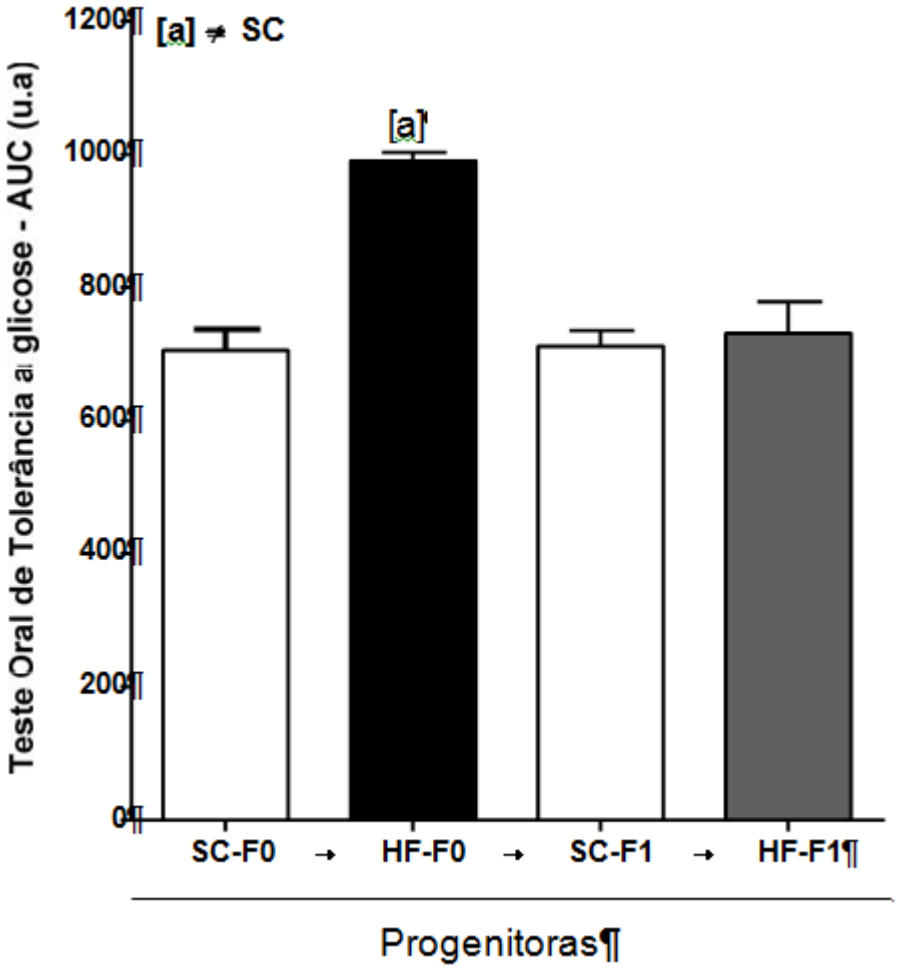
Legenda: Símbolos acima denotam diferença significativa, onde [a] simboliza diferença do grupo SC=grupo que recebeu dieta padrão durante todo experimento. Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Nos casos sinalizados P<0,05.

Fonte: O autor, 2015

4.1.2 Teste oral de tolerância à glicose - TOTG

O TOTG das progenitoras foi realizado durante o período pré-gestacional, a fim de evitar o estresse durante a gravidez. O grupo HF-0 apresentou maior área sob a curva, evidenciando intolerância à glicose em comparação com o grupo SC, corroborando com o aumento da massa corporal no mesmo período (P=0,0001). No entanto, as progenitoras HF-F1 não apresentaram diferença significativa no TOTG durante o período pré-acasalamento, em comparação com as progenitoras SC-F1 (P=0,73), figura 6.

Figura 6 - Teste oral de tolerância à glicose, representado pela avaliação da área sob a curva das progenitoras no período pré-gestacional, após 8 semanas de dieta hiperlipídica ou padrão



Legenda: Símbolos acima denotam diferença significativa, onde [a] simboliza diferença do grupo SC=grupo que recebeu dieta padrão durante todo experimento. Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Nos casos sinalizados P<0,05.

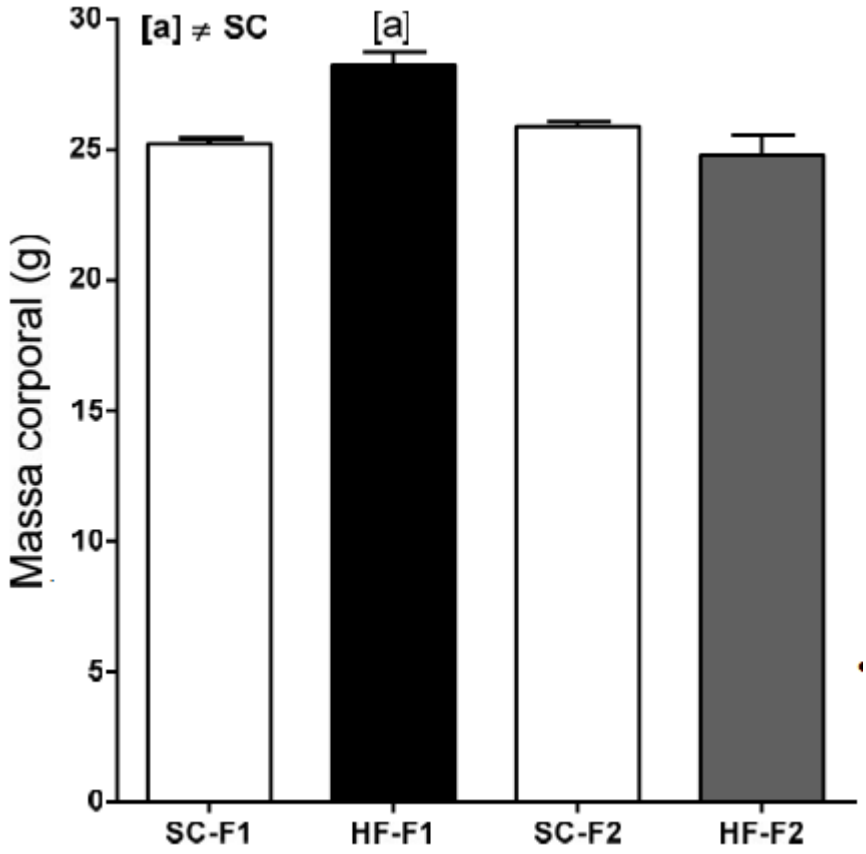
Fonte: O autor, 2015

4.2 **Prole**

4.2.1 A dieta materna altera a massa corporal da prole F1, mas não da F2

A massa corporal (MC) da prole HF-F1 foi significativamente maior em comparação ao grupo SC-F1 aos 21 dias e aos 3 meses (*P*=0.001). No entanto, a prole HF-F2 não apresentou diferença significativa em comparação com a MC do grupo SC-F2 (*P*=0,21). Vale ressaltar que estes animais começaram a consumir dieta controle ao desmame (21 dias após o nascimento), o que implica em um efeito da superalimentação materna na alteração das vias metabólicas, figura 7.

Figura 7 - Massa corporal da prole da primeira (F1) e segunda gerações (F2) aos 3 meses de idade



Legenda: Símbolos acima denotam diferença significativa, onde [a] simboliza diferença do grupo SC=grupo que recebeu dieta padrão durante todo experimento, tanto na F1 quanto na F2. Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Nos casos sinalizados *P*<0,05.

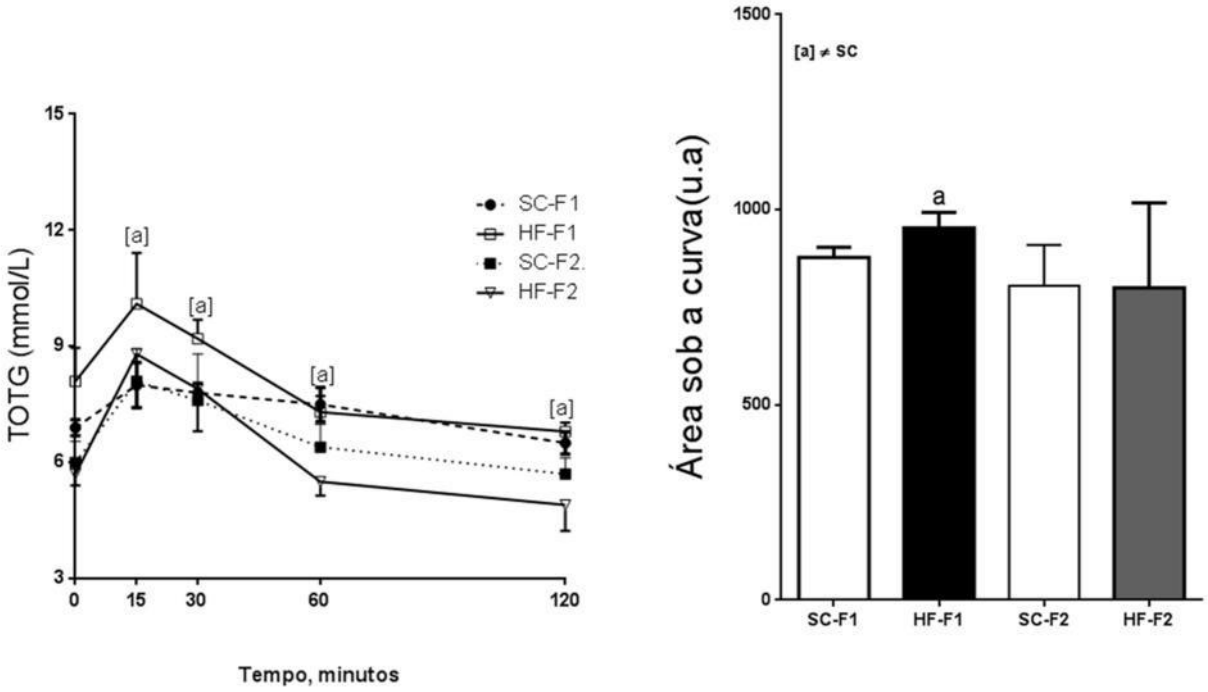
Fonte: O autor, 2015

4.2.2 Dieta hiperlipídica materna altera o metabolismo de carboidratos diferentemente em ambas gerações.

A prole HF-F1 apresentou significativa hiperinsulinemia em relação ao grupo SC- F1 (P=0,009). Do mesmo modo, o grupo HF-F2 também apresentou diferença significativa nos valores de insulina em comparação com grupo SC-F2 (P=0,03).

No que diz respeito a intolerância à glicose, o TOTG revelou maior área sob a curva na prole HF-F1 (+ 8,6%) em comparação com a prole SC-F1 (P=0,006), mostrando a intolerância à glicose na prole programada. No entanto, este resultado não foi observado na prole da segunda geração, pois não houve diferença entre a área sob a curva do TOTG dos grupos HF-F2 e SC-F2 (P=0,9). Em ambas as gerações o resultado do TOTG corroborou com a massa corporal, figura 8.

Figura 8 - Teste oral de tolerância à glicose da primeira (F1) e segunda gerações (F2)



Legenda: Símbolos acima denotam diferença significativa, onde [a] simboliza diferença do grupo SC=grupo que recebeu dieta padrão durante todo experimento, tanto na F1 quanto na F2. Os valores são apresentados como média e desvio padrão da média. Nos casos sinalizados P<0,05.

Fonte: O autor, 2015

4.2.3 Dieta materna hiperlipídica altera lipídios plasmáticos apenas na primeira geração

A prole HF-F1 apresentou um aumento significativo nos níveis séricos de triglicerídeos (+ 14%) e do colesterol total (+ 37%) em relação ao grupo SC-F1 (P<0,05). Por outro lado, não foi observada diferença entre colesterol total e triglicerídeos plasmáticos dos grupos HF-F2 eo à prole SC-F2, tabela 2.

A massa hepática foi 20% maior no grupo HF-F1 em comparação ao grupo SC-F1 (P=0,006). No entanto, não houve diferença significativa na massa hepática dos grupos HF-F2 e SC-F2 (P=0,2). Em relação aos triglicerídeos hepáticos, o grupo HF-F1 apresentou 30% mais do que o grupo SC-F1 (P=0,03). No entanto, a segunda geração não apresentou alterações neste parâmetro, tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros bioquímicos e hepáticos da prole da primeira e segunda gerações aos 3 meses de idade

Data	**SC-F1**	**HF-F1**	**SC-F2**	**HF-2**
Colesterol Total (mg/dl)	125,3 ± 3,27	172,0 ± 8,8 [a]	111,2 ± 2,69	114,8 ± 1,61
Triglicerídeos (mg/dl)	84,92 ± 1,77	96,78 ± 1,03 [a]	86,82 ± 2,05	88,02 ± 1,66
Insulina (IU/L)	3,10 ± 0,43	5,40 ± 0,52[a]	3,60 ± 0,33	4,88 ± 0,37
Massa hepática (mg)	0,51 ± 0,02	0,60 ± 0,01	0,44 ± 0,02	0,48 ± 0,02
TGP (IU/L)	37,60 ± 0,92	50,60 ± 2,60 [a]	37,40 ± 2,11	37,00 ± 3,39
Triglicerídeo hepático (mg/dL/mg)	1,44 ± 0,11	1,86 ± 0,11[a]	1,97 ± 0,19	2,31 ± 0,10

Legenda: Os valores são apresentados como média e desvio padrão da média. Nos casos sinalizados P<0,05, [a] simboliza diferença do grupo SC da respectiva geração.
Fonte: O autor, 201

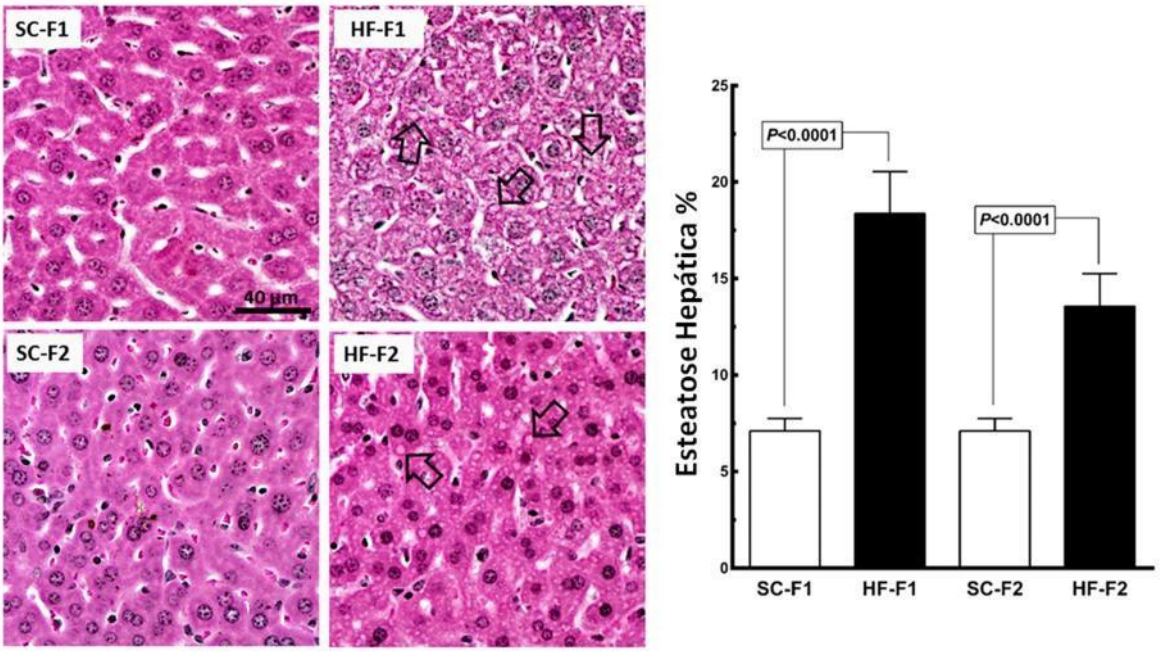
4.2.4 Dieta materna favorece a via da lipogênese e aumenta a esteatose hepática em ambas as gerações

Quanto à densidade de volume da esteatose hepática, a prole HF-F1 apresentou maior percentual de vesículas lipídicas depositadas no fígado (+18%) quando comparado a prole

SC-F1 (+7%, $P<0,0001$), em conformidade com os níveis de triglicerídeos no fígado. Por outro lado, apesar do grupo HF-F2 não ter apresentado valores alterados de triglicerídeo hepático, esse grupo apresentou maior percentual de esteatose hepática (+13%) quando comparado com o grupo SC-F2 (+7%, $P<0,0001$). Em ambos os grupos HF-F1 e HF-F2 foram observados a deposição de microvesículas de lipídios, figura 9.

A enzima ALT, que atua como um marcador de lesão hepática, foi significativamente mais elevada na prole HF-F1 em comparação a prole SC-F1 ($P=0,001$). Apesar de apresentar um pouco de lesão hepática a prole HF-F2 não apresentou valores alterados de ALT em comparação com prole SC-F2 ($P=0,92$).

Figura 9 -Fotomicrografias da Esteatose hepática (coloração por H&E, mesmo aumento em todas as fotos) e quantificação da esteatose hepatica

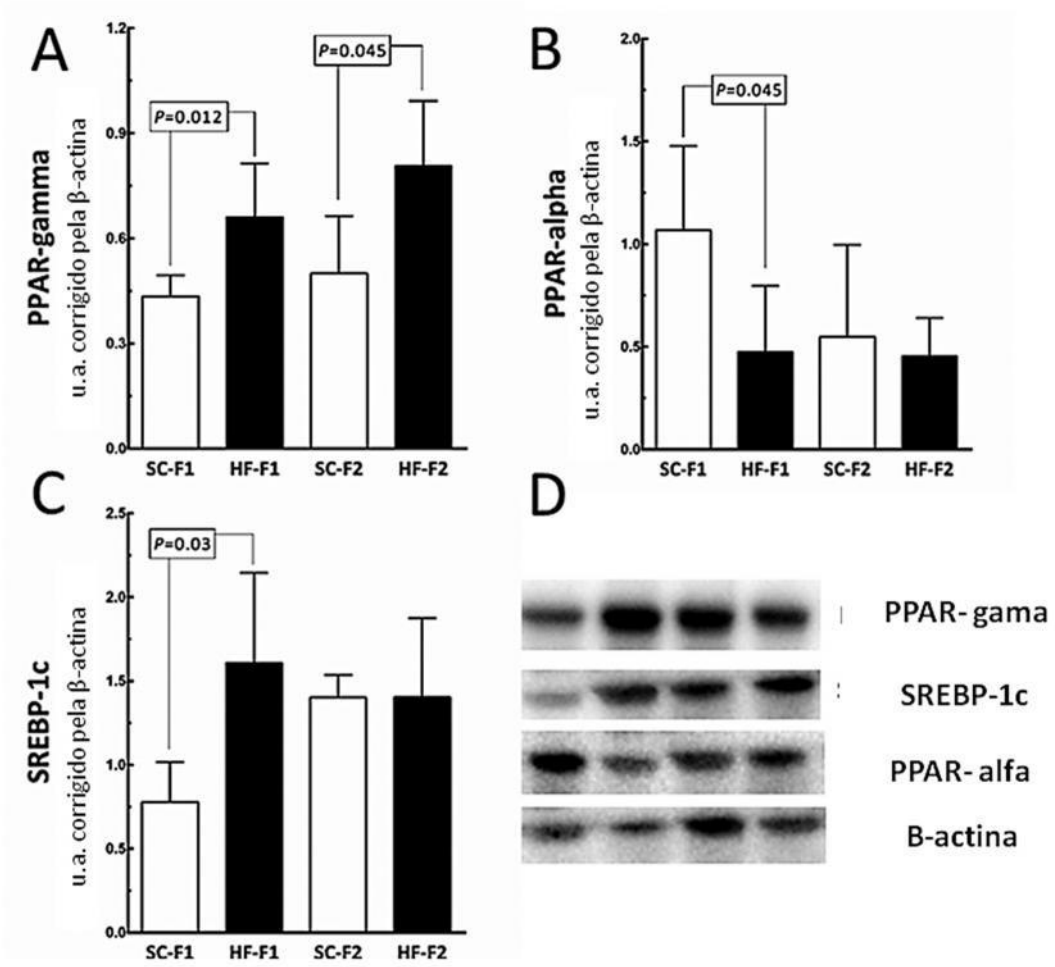


Legenda: Na esquerda: Vê-se o conteúdo lipídico presente nos hepatócitos dos grupos HFs com presença de esteatose, em comparação a uma menor deposição de lipídios nos grupos SCs. Direita: Quantificação da esteatose hepática, através da contagem de pontos. Os valores são apresentados como média e desvio padrão. Nos casos sinalizados $P<0,05$.
Fonte: O autor, 2015

No que se refere a expressão de proteínas hepáticas, PPAR-alfa, PPAR-gama e SREBP-1 c, HF-F1 mostrou um aumento da expressão de PPAR-gama e SREBP1- C, (ambos

são fatores de transcrição que estão relacionados com a lipogênese) quando comparados com proles F1SC (*P*=0,01). Por outro lado, a expressão de PPAR-alfa, relacionadas com beta-oxidação, foi menor em HF-F1 em que SC-F1 (*P*=0,04). Na segunda geração, a descendência de HF-F2 só apresentou expressão aumentada de PPAR-gama, quando comparado com SC-F2 (*P*=0,04). Apesar de não haver diferença em relação SREBP-1 e PPAR-alfa, a superexpressão do PPAR- gama provoca lipogênese hepática elevada, causando esteatose hepática como encontrado em animais HF-F2, figura 10.

Figura 10 - *Western blot* da expressão de PPAR-gama, SREBP-1c, PPAR-alfa no fígado por beta-actina (média e desvio padrão da media)



Legenda: Nos casos sinalizados *P*<0,05.
Fonte: O autor, 2015

5 **DISCUSSÃO**

O presente estudo fornece informações originais sobre o impacto de uma dieta materna hiperlipídica durante a gestação e lactação e seus efeitos na prole de camundongos da primeira geração (F1) e segunda geração (F2).

Evidências, tanto em humanos quanto em animais, sugerem que as alterações na programação metabólica não são limitadas apenas a F1, que é diretamente exposta à agressão uterina, mas podem ser transmitidas às gerações subsequentes que não têm exposição direta ao insulto (Jimenez-Chillaron *et al.*, 2009; Dunn e Bale, 2011). Estes efeitos podem ser transmitidos através de ambos os progenitores materno e paterno (Nathanielsz e Hanson, 2003; Pentinat *et al.*, 2010; Dunn e Bale, 2011). A literatura descreve que entre os órgãos que apresentam alterações à programação materna, o fígado é um dos primeiros órgãos a mostrar susceptibilidade aos efeitos prejudiciais da superalimentação no feto (Howie *et al.*, 2009). Dessa forma, o estudo presente se concentrou na análise da DHGNA avaliando a prole F1 e F2 em um modelo de mães alimentadas com dieta hiperlipídica. Os resultados revelaram que na idade adulta a prole apresentou resultados de MC, TOTG, insulina, lipídios, e parâmetros hepáticos mais pronunciadas na F1 do que na F2, porém ambas as proles apresentaram esteatose hepática.

Atualmente estudos concentram-se em pesquisar a relação da obesidade materna durante a gravidez e o aumento do risco de doenças metabólicas na prole, incluindo intolerância à glicose, resistência à insulina, obesidade e DHGNA. No entanto, o mecanismo subjacente a esta programação ainda não é bem compreendido (Alfaradhi *et al.*, 2014). Foi observado que a obesidade materna aumentou a sensibilidade ao ganho de peso na prole mesmo sem alterações no peso ao nascer (Oben *et al.*, 2010; Aiken e Ozanne, 2014). Em nosso estudo, observamos que a prole HF-F1 apresentou maior MC no final do desmame até 3 meses de idade, mesmo sem apresentar diferença no nascimento. No entanto, a prole HF-F2 não mostrou diferença na MC aos 3 meses.

Os modelos mais comuns utilizados para estudar programação materna são os roedores. O modelo de dieta hiperlipídica durante a gravidez tem mostrado

resultados variáveis sobre a MC da prole ao nascer, sendo relatado nenhum efeito sobre a MC da prole ao nascer, redução da MC ou aumento da MC ao nascer (Buckley *et al.*, 2005; Graus-Nunes *et al.*, 2015). Vimos que o ganho de MC da prole de mães que receberam dieta hiperlipídica não apresentou diferença ao nascimento, no entanto foi maior no final do experimento para a F1 e sem diferença entre os grupos da F2, concordando com estudos prévios (Samuelsson *et al.*, 2008; Bringhenti *et al.*, 2015; Ornellas *et al.*, 2015).

Já está descrito que a prole de progenitoras alimentadas com dietas hiperlipídica cursam com resistência à insulina (Graus-Nunes *et al.*, 2015) e intolerância à glicose na idade adulta (Drake *et al.*, 2011). Nosso estudo demonstra alterações na sensibilidade à insulina e intolerância à glicose na prole F1, mas não na prole F2. Os fatores maternos que causam os distúrbios metabólicos na prole são desconhecidos, mas provavelmente incluem hiperinsulinemia materna. Há declínio na homeostase da glicose com o tempo em modelos de programação. Está descrito que a prole de progenitores obesos se tornou hiperinsulinêmica aos 3 meses de idade e progrediu para o quadro de diabetes aos 6 meses de idade (Drake *et al.*, 2011).

A obesidade materna induzida por dieta provoca um aumento da concentração de triglicerídeo materno, que, consequentemente também aumenta na prole devido ao fato de passar através da placenta, resultando em maior transporte e deposição de lipídeos em órgãos fetais. Isto pode explicar os nossos resultados com aumento do colesterol total, triglicerídeos plasmáticos e hepáticos na prole HF-F1. No entanto, a prole HF-F2 não apresentou esta alteração e novos estudos sugerem que os efeitos nas gerações posteriores podem ser diferentes daqueles porque a primeira geração foi exposta diretamente a agressão no útero.

Em relação aos triglicerídeos hepáticos, o consumo da dieta hiperlipídica materna durante a gravidez conduziu a aumentos significativos nos níveis de ácidos graxos livres no feto. É postulado que a dieta hiperlipídica desempenha um papel na influência do fenótipo da prole independente da resistência insulina por intermédio da influência da MC e triglicerídeos hepáticos da prole. No entanto, a associação da resistência à insulina materna e dieta hiperlipídica provoca efeitos adicionais sobre a adiposidade no início da vida (McCurdy *et al.*, 2009).

O fígado sempre é muito suscetível aos efeitos da nutrição fetal (Howie *et al.*, 2009). A prole de progenitores obesas apresentam maior MC e risco de desenvolvimento de esteatose hepática em comparação com a prole de progenitoras magras (Fall, 2011). O nosso estudo demonstrou a presença de esteatose hepática na prole de mães que receberam dieta hiperlipídica, mesmo a prole sendo alimentada com dieta padrão. Esteatose foi

observada na primeira geração (HF-F1) e também na segunda geração (HF-F2), a qual mostrou depósitos de microvesículas lipídicas no parênquima hepático. Uma explicação para a presença de esteatose na prole é justificada pelo fato de que no útero o alto teor de gordura oriundo da exposição à dieta causa esteatose nos fetos no terceiro trimestre associado ao aumento do estresse oxidativo hepático e apoptose (Elahi *et al.*, 2009).

Além disso, a obesidade materna pode levar a um aumento da massa do fígado e hipertrofia dos adipócitos na prole, sugerindo aumento de respostas lipogênicas da programação (Knebel *et al.*, 2012). A literatura descreve que a exposição à obesidade materna, devido ao aumento da captação de calorias ou alto teor de gordura na alimentação, resulta no aumento da massa do fígado e acúmulo de lipídios. Isto é atribuído ao aumento da lipogênese e diminuição da lipólise. Pontos críticos da regulação nas respectivas vias têm sido relacionados com aumento da SREBP-1c acompanhados de genes envolvidos na biossíntese hepática de lipídios, além da redução da expressão de PPAR-alfa e genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos.

No presente estudo observamos no grupo HF-F1 o aumento da expressão de PPAR-gama e o gene SREBP-1c associado a uma redução na expressão de PPAR-alfa, que é um regulador chave de processos no catabolismo lipídico. Já na prole HF-F2 foram observadas apenas alterações na expressão do PPAR-gama. Esta pode ser a explicação para a presença de esteatose hepática encontrada na prole das duas gerações, pois o PPAR-gama está associado à lipogênese e à expressão do gene alvo SREBP-1c que é responsável pela regulação dos genes necessários para a lipogênese, que, consequentemente, aumenta o acúmulo de lipídios (Shankar *et al.*, 2010).

Outro estudo, utilizando um modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos, descreveu a expressão aumentada do gene hepático da SREBP-1c na prole com 15 semanas de idade (Bruce *et al.*, 2009), concordando com as informações de outro estudo, com alteração da expressão do gene da lipogênese antes do início da obesidade da prole de progenitoras com sobrepeso (Shankar *et al.*, 2010).

O tempo de execução da dissertação, de 24 meses no mestrado, é pequeno para expandir o estudo para a terceira geração. Mas este seria um desdobramento interessante do estudo, que almejamos realizar em um outro momento.

CONCLUSÃO

A obesidade materna pré-gestacional e gestacional provoca efeitos sobre a estrutura e metabolismo hepático que ultrapassam a primeira geração, independentemente da dieta da prole.

A obesidade materna altera a lipogênese e a beta-oxidação hepáticas na prole por regulação positiva de PPAR-gama e regulação negativa do PPAR-alfa.

A prole da segunda geração tem desequilíbrio dos PPARs, favorecendo o acúmulo de lipídios e metabolismo hepático prejudicado nestes animais que não foram diretamente expostos ao insulto materno.

Estas observações sinalizam a necessidade urgente de controlar a epidemia da obesidade, o que mostra aumento da prevalência entre as mulheres em idade fértil.

REFERÊNCIAS

Aaltonen J, Ojala T, Laitinen K, Poussa T, Ozanne S, Isolauri E. Impact of maternal diet during pregnancy and breastfeeding on infant metabolic programming: a prospective randomized controlled study. Eur J Clin Nutr 2011; 65:10-19.

Aballay LR, Eynard AR, Diaz Mdel P, Navarro A, Munoz SE. Overweight and obesity: a review of their relationship to metabolic syndrome, cardiovascular disease, and cancer in South America. *Nutr Rev* 2013; 71:168-179.

Abd El-Kader SM, El-Den Ashmawy EM. Non-alcoholic fatty liver disease: The diagnosis and management. *World J Hepatol* 2015; 7:846-858.

Adamo KB, Ferraro ZM, Goldfield G, Keely E, Stacey D, Hadjiyannakis S *et al.* The Maternal Obesity Management (MOM) Trial Protocol: A lifestyle intervention during pregnancy to minimize downstream obesity. *Contemp Clin Trials* 2013; 35:87-96.

Aguila MB, Pinheiro AR, Parente LB, Mandarim-de-Lacerda CA. Dietary effect of different high-fat diet on rat liver stereology. *Liver Int* 2003; 23:363-370.

Aguila MB, Santos CF, Pinheiro-Mulder AR, Faria TS, Mandarim-de-Lacerda CA. 2010. *Hepatic insulin resistance and nonalcoholic fatty liver disease*. In: Molière J, Gauthier L, editors. Insulin resistance: symptoms, causes and treatment. Hauppauge, NY: Nova Science Pu. p 1-44.

Aiken CE, Ozanne SE. Transgenerational developmental programming. *Hum Reprod Update* 2014; 20:63-75.

Alfaradhi MZ, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Musial B, Fowden A, Ozanne SE. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014; 307:R26-34.

Alfaradhi MZ, Ozanne SE. Developmental programming in response to maternal overnutrition. *Front Genet* 2011; 2:27.

Angulo P. Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev* 2007; 65:S57-63. Barbosa-da-Silva S, da Silva NC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Liver damage is not reversed during the lean period in diet-induced weight cycling in mice. *Hepatol Res* 2013; 44:450-459.

Barbosa-da-Silva S, Fraulob-Aquino JC, Lopes JR, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Weight cycling enhances adipose tissue inflammatory responses in male mice. *PLoS One* 2012; 7:e39837.

Barker DJ. The fetal and infant origins of adult disease. *BMJ* 1990; 301:1111.

Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest* 1995; 25:457-463.

Barker DJ. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 2007; 261:412-417.

Barres R, Zierath JR. DNA methylation in metabolic disorders. *Am J Clin Nutr* 2011; 93:897S-900.

Bautista CJ, Guzman C, Rodriguez-Gonzalez GL, Zambrano E. Improvement in metabolic effects by dietary intervention is dependent on the precise nature of the developmental programming challenge. *J Dev Orig Health Dis* 2015; 6:327- 334.

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.

Benyshek DC, Johnston CS, Martin JF. Glucose metabolism is altered in the adequately-nourished grand-offspring (F3 generation) of rats malnourished during gestation and perinatal life. *Diabetologia* 2006; 49:1117-1119.

Borengasser SJ, Lau F, Kang P, Blackburn ML, Ronis MJ, Badger TM *et al.* Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. *PLoS ONE* 2011; 6:e24068.

Bringhenti I, Ornellas F, Martins MA, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Early hepatic insult in the offspring of obese maternal mice. *Nutr Res* 2015; 35:136- 145.

Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC *et al.* Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology* 2009; 50:1796-1808.

Bruce KD, Hanson MA. The developmental origins, mechanisms, and implications of metabolic syndrome. *J Nutr* 2010; 140:648-652.

Buckley AJ, Keseru B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats. *Metabolism* 2005; 54:500-507.

Bugianesi E, Gastaldelli A, Vanni E, Gambino R, Cassader M, Baldi S *et al.* Insulin resistance in non-diabetic patients with non-alcoholic fatty liver disease: sites and mechanisms. *Diabetologia* 2005; 48:634-642.

Cachelin FM. Predictors of maternal child-feeding practices in an ethnically diverse sample and the relationship to child obesity. *Obesity (Silver Spring)* 2013; 10.1002/oby.20385.

Campion J, Milagro F, Martinez JA. Epigenetics and obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci* 2010; 94:291-347.

Carmody JS, Wan P, Accili D, Zeltser LM, Leibel RL. Respective contributions of maternal insulin resistance and diet to metabolic and hypothalamic phenotypes of progeny. *Obesity (Silver Spring)* 2011; 19:492-499.

Catalano PM. Obesity and pregnancy--the propagation of a viscous cycle? *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3505-3506.

Catalano PM, Presley L, Minium J, Hauguel-de Mouzon S. Fetuses of obese mothers develop insulin resistance in utero. *Diabetes Care* 2009; 32:1076-1080.

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.
Cerf ME. High fat diet modulation of glucose sensing in the beta-cell. *Med Sci Monit* 2007; 13:RA12-17.

Chen JH, Cottrell EC, Ozanne SE. Early growth and ageing. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* 2010; 65:41-50; discussion 50-44.

Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI. Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103:17308-17312.

Cutfield WS, Hofman PL, Mitchell M, Morison IM. Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease? *Pediatr Res* 2007; 61:68R- 75R.

Desai M, Jellyman JK, Ross MG. Epigenomics, gestational programming and risk of metabolic syndrome. *Int J Obes (Lond)* 2015; 39:633-641.

Di Cianni G, Miccoli R, Volpe L, Lencioni C, Ghio A, Giovannitti MG *et al.* Maternal triglyceride levels and newborn weight in pregnant women with normal glucose tolerance. *Diabet Med* 2005; 22:21-25.

Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2014; 28:637-653.

Dolinoy DC, Jirtle RL. Environmental epigenomics in human health and disease. *Environ Mol Mutagen* 2008; 49:4-8.

Drake AJ, Liu L, Kerrigan D, Meehan RR, Seckl JR. Multigenerational programming in the glucocorticoid programmed rat is associated with generation-specific and parent of origin effects. *Epigenetics* 2011; 6:1334-1343.

Dunn GA, Bale TL. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. *Endocrinology* 2011; 152:2228-2236.

Ekelund U, Ong KK, Linne Y, Neovius M, Brage S, Dunger DB *et al.* Association of weight gain in infancy and early childhood with metabolic risk in young adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2007; 92:98-103.

Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long- term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr* 2009; 102:514-519.

Fall CH. Evidence for the intra-uterine programming of adiposity in later life. *Ann Hum Biol* 2011; 38:410-428.

Frantz ED, Aguila MB, Pinheiro-Mulder Ada R, Mandarim-de-Lacerda CA. Transgenerational endocrine pancreatic adaptation in mice from maternal protein restriction in utero. *Mech Ageing Dev* 2011; 132:110-116.

Frias AE, Morgan TK, Evans AE, Rasanen J, Oh KY, Thornburg KL *et al.* Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology* 2011; 152:2456-2464.

Gluckman PD, Hanson MA. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. *Science* 2004; 305:1733-1736.

Graus-Nunes F, Dalla Corte Frantz E, Lannes WR, da Silva Menezes MC, Mandarim- de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Pregestational maternal obesity impairs endocrine pancreas in male F1 and F2 progeny. *Nutrition* 2015; 31:380-387.

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.

Guibert S, Forne T, Weber M. Global profiling of DNA methylation erasure in mouse primordial germ cells. *Genome Res* 2012; 22:633-641.

Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 1995; 57:681-686.

Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol* 2011; 106:272-280.

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.

James WP. The epidemiology of obesity: the size of the problem. *J Intern Med* 2008; 263:336-352.

Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M, Gesta S, Pentinat-Pelegrin T, Faucette RR *et al.* Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. *Diabetes* 2009; 58:460-468.

Karagozian R, Derdak Z, Baffy G. Obesity-associated mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Metabolism* 2014; 63:607-617.

Knebel B, Haas J, Hartwig S, Jacob S, Kollmer C, Nitzgen U *et al.* Liver-specific expression of transcriptionally active SREBP-1c is associated with fatty liver and increased visceral fat mass. *PLoS One* 2012; 7:e31812.

Koteish A, Diehl AM. Animal models of steatosis. *Semin Liver Dis* 2001; 21:89- 104.

Kral JG, Biron S, Simard S, Hould FS, Lebel S, Marceau S *et al.* Large maternal weight loss from obesity surgery prevents transmission of obesity to children who were followed for 2 to 18 years. *Pediatrics* 2006; 118:e1644-1649.

Lazo M, Clark JM. The epidemiology of nonalcoholic Fatty liver disease: a global perspective. *Semin Liver Dis* 2008; 28:339-350.

Locke AE, Kahali B, Berndt SI, Justice AE, Pers TH, Day FR *et al.* Genetic studies of body mass index yield new insights for obesity biology. *Nature* 2015; 518:197-206.

Magliano DC, Bargut TC, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome proliferator-activated receptors-alpha and gamma are targets to treat offspring from maternal diet-induced obesity in mice. *PLoS One* 2013; 8:e64258.

Marchesini G, Brizi M, Bianchi G, Tomassetti S, Bugianesi E, Lenzi M *et al.* 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 *et al.* Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest* 2009; 119:323-335.

McLachlan JA. Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocr Rev* 2001; 22:319-341.

Nascimento FA, Ceciliano TC, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Maternal vitamin D deficiency delays glomerular maturity in F1 and F2 offspring. *PLoS One* 2012; 7:e41740.

Nathanielsz PW, Hanson MA. The fetal dilemma: spare the brain and spoil the liver.*J Physiol* 2003; 548:333.

Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews PJ, Morgan ML, McKee C *et al.* Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J Hepatol* 2010; 52:913- 920.

Oken E, Gillman MW. Fetal origins of obesity. *Obes Res* 2003; 11:496-506.

Ornellas F, Souza-Mello V, Mandarim-de-Lacerda CA, Aguila MB. Programming of obesity and comorbidities in the progeny: lessons from a model of diet-induced obese parents. *PLoS One* 2015; 10:e0124737.

Pentinat T, Ramon-Krauel M, Cebria J, Diaz R, Jimenez-Chillaron JC. Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. *Endocrinology* 2010; 151:5617-5623.

Pinheiro AR, Salvucci ID, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Protein restriction during gestation and/or lactation causes adverse transgenerational effects on biometry and glucose metabolism in F1 and F2 progenies of rats. *Clin Sci (Lond)* 2008; 114:381-392.

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.

Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Bleker OP. Plasma lipid profiles in adults after prenatal exposure to the Dutch famine. *Am J Clin Nutr* 2000; 72:1101-1106.

Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, JansenEH *et al.* 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.

Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, Badger TM. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 294:R528-538.

Shankar K, Kang P, Harrell A, Zhong Y, Marecki JC, Ronis MJ *et al.* Maternal overweight programs insulin and adiponectin signaling in the offspring. *Endocrinology* 2010; 151:2577-2589.

Tosh DN, Fu Q, Callaway CW, McKnight RA, McMillen IC, Ross MG *et al.* Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 299:G1023-1029.

Trasler JM. Epigenetics in spermatogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 306:33-36.
Vandenbergh JG, Huggett CL. The anogenital distance index, a predictor of the intrauterine position effects on reproduction in female house mice. *Lab Anim Sci* 1995; 45:567-573.

Wang J, Wu Z, Li D, Li N, Dindot SV, Satterfield MC *et al.* Nutrition, epigenetics, and metabolic syndrome. *Antioxid Redox Signal* 2012; 17:282-301.

Whitaker RC. Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics* 2004; 114:e29-36.

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.

Zambrano E. [The transgenerational mechanisms in developmental programming of metabolic diseases]. *Rev Invest Clin* 2009; 61:41-52.

Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez- Gonzalez GL *et al.* Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol* 2005; 566:225-236.

ANEXO A: Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/017/2013** sobre **"Efeitos transgeracionais no fígado da prole de camundongos programados da primeira a terceira gerações"**, sob a responsabilidade de **Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **20/05/2013.** Este certificado expira em **20/05/2017.**

Rio de Janeiro, 20 de Maio de 2013.

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profª Dra. Patricia Cristina Lisboa da Silva
Profª Adj. do Depto. Ciências Fisiológicas / IBRAG / UERJ
Matricula 34765-8

/.ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br

ANEXO B: Termo de Submissão à Revista International Journal of Morphology

De : Mariano Guillermo Armando Del Sol Calderon <mariano.delsol@ufrontera.cl>
Data: 07/07/2015 17h41 (GMT-03:00)
Para: Sandra Barbosa <sandrabarbosasilva@gmail.com>
Assunto: IJM 260.15

Dear Dr. Sandra Barbosa

I received your article entitled "Pre-gestational maternal obesity enhances lipogenesis and non-alcoholic fatty liver disease until the F2 generation of mice offspring".

Thank you for submitting your manuscript to be considered for publication in International Journal of Morphology.

You will be notified as soon as the editorial board decides concerning the publication of your manuscript. Your tracking number is: IJM 260.15

Your Sincerely

Dr. Mariano del Sol

Editor

Int. J. Morphol.