



ARINE DE MATTOS MELO

**ATIVACÃO DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL FORMADAS-UPR NA PROLE DE
CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Limeira

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

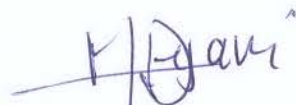
Arine de Mattos Melo

**ATIVAÇÃO DA RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL FORMADAS-UPR NA PROLE DE
CAMUNDONGOS COM OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA HIPERLIPÍDICA
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP para obtenção do título de Mestre em Ciências da nutrição e do Esporte e Metabolismo

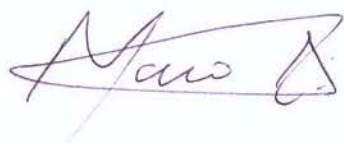
Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Orientador: Profº Dr. Marcio Alberto Torsoni


PROF. DR. MARCOS HENRIQUE DEGANI
Coordenador de Pós-Graduação
Faculdade de Ciências Aplicadas da Unicamp - Limeira
Matrícula: 296777

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DISSERTAÇÃO/TESE DEFENDIDA PELA ALUNA

ARINE DE MATTOS MELO E ORIENTADA PELO PROF DR. MARCIO ALBERTO TORSONI



Limeira

2013

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Aplicadas
Sueli Ferreira Júlio de Oliveira - CRB 8/2380

M49a Melo, Arine de Mattos, 1989-
Ativação da resposta a proteínas mal formadas - UPR na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação / Arine de Mattos Melo. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Marcio Alberto Torsoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Estresse de retículo endoplasmático. 2. Hipotálamo. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Obesidade. 5. Imprint metabólico. I. Torsoni, Marcio Alberto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Activation of unfolded proteins response - UPR in the offspring of mice with obesity induced by high fat diet during pregnancy and lactation

Palavras-chave em inglês:

Endoplasmic reticulum stress

Hypothalamus

High fat diet

Obesity

Metabolic imprint

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Banca examinadora:

Marcio Alberto Torsoni [Orientador]

Eduardo Rochete Ropelle

Márcia Queiroz Latorraca

Data de defesa: 02-10-2013

Programa de Pós-Graduação: Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo

Limeira, 02 de outubro de 2013

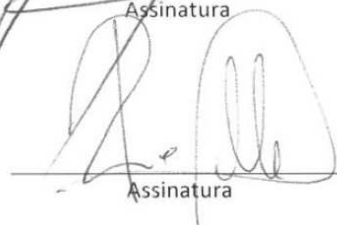
BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a) Marcio Alberto Torsoni



Assinatura

Prof(a). Dr(a) Eduardo Rochete Ropelle



Assinatura

Prof(a). Dr(a) Eliane Beraldi Ribeiro

Assinatura

Prof(a). Dr(a) José Rodrigo Pauli

Assinatura

Prof(a). Dr(a) Márcia Queiroz Latorraca



Assinatura

Aos meus pais, Arilene e Nelson, pelo amor incondicional, por me darem as mãos nos primeiros passos e tombos de minha vida, e principalmente por me ajudarem a cada dia a criar asas para voar e seguir com minhas escolhas e decisões.

Dedico

AGRADECIMENTOS

À *Deus*, o qual não existem palavras para tamanho agradecimento, por me dar o dom da vida, ser minha fonte de fé e esperança, por conduzir e guiar os meus passos, e colocar pessoas maravilhosas ao meu lado, e assim criar verdadeiros laços de amor e amizade para toda vida.

Ao meu porto seguro, minha *família*, meus pais *Arilene* e *Nelson*; minhas irmãs *Ariane* e *Mayra*. Uma vez eu li “... *Bom é partir. Bom mesmo é poder voltar... A partida nos abre os olhos para o que deixamos. A distância nos permite mensurar os espaços deixados. Por isso, partidas e chegadas são instrumentos que nos indicam quem somos, o que amamos e o que é essencial para que a gente continue sendo... É consequência natural que faz o coração querer voltar ao ponto inicial, ao lugar onde tudo começou.*” Pe. *Fábio de Melo*.

Pelo amor mais puro, inocente, simples e sincero. Amor de cão, amor de amigo, amor de *Fiona*, “*Um cachorro não se importa se você é rico ou pobre, apenas de seu coração a ele, e ele lhe dará o dele.*” *Marley e Eu*.

À grande família; *tios, tias, primos e primas*, frutos do grande amor de meus avós maternos (em memória) *Maria Conceição* e *Moacyr Nunes*; avós paternos *Maria Miranda* e *José Miranda*. O maior conhecimento vem do saber ouvir os mais velhos e enxergar a felicidade em um simples olhar, vocês são meus maiores exemplos de vida.

Àquele que acreditou em mim desde o início, pelo professor de graduação que me encantou com as aulas, e assim fazer despertar a vontade de estudar mais, saber mais e descobrir o verdadeiro sentido da palavra *Ciência*. Obrigada *Marcio Torsoni*, pela paciência, pelo dom de saber ensinar e me proporcionar crescer como pessoa, aluna, bióloga e pesquisadora através de sua excelente orientação.

Às professoras *Adriana Torsoni* e *Marciane Milanski*, pelo exemplo de profissionais que me inspiram a cada dia e pelo convívio que só me enobrece.

Ao professor *Lício Velloso*, pela oportunidade de trabalhar e desenvolver minha pesquisa em colaboração com seu laboratório, obrigada por contribuir com meu crescimento profissional.

À todos os amigos e colegas do *Labsincel*, pela oportunidade de trabalhar junto, especialmente a *Erika Anne*, *Gerson Ferraz* e *Márcio Cruz*, pelo apoio e competência naquilo que faz.

A todos os amigos, colegas, pesquisadores e colaboradores do *LabDime*; *Ana Carolina Ferraz*, *Andressa Reginato*, *Angélica Sartori*, *Caroline Okino*, *Daisuke Hayashi*, *Dani Vitorino*, *Débora Vitoréli*, *Fernanda Borges*, *Fernando Simabuco*, *Gustavo dos Santos*, *Josiane Miyamoto*, *Laís*

Simino, Mariana Portovedo, Marina Fontana, Milena Versutti, Natália F. Costa, Rafaela Benatti, Simone Lemes, Tanyara Baliani e Thais de Fante; pelo convívio diário, pelas risadas, conversas, pela ajuda nos trabalhos em bancada e por fazerem do laboratório minha segunda casa.

Pelas mãos que se dedicaram para a realização desse trabalho, muito obrigada *Carol Okino, Letícia Souza e Rafaela Benatti*, vocês fizeram a diferença. Agradeço à *Letícia Souza*, pela amizade construída, pela facilidade e dom de ensinar e se tornar um espelho para mim, e por participar e contribuir de forma direta para realização desse trabalho.

Por aqueles que de alguma maneira durante esses dois anos contribuíram para a realização desse trabalho, *Fernanda Borges, Gustavo Santos, Janaína Cursino, Laís Simino, Mariana Portovedo, Nicole Guimarães e Simone Lemes*, muito obrigada.

Ao casal, *Adriana Torsoni e Marcio Torsoni*, não apenas pelo exemplo profissional, mas pelo exemplo de vida, por serem mais que professores, serem amigos, e eu saber que tenho a quem socorrer na ausência de meus pais, mesmo que de madrugada vocês nunca vão dizer não, obrigada por serem quem são em minha vida.

Pela convivência diária, por dividir o mesmo teto, pelas conversas jogadas fora, pelos fins de semanas sem ter nada para fazer (risos), por deixar nossa casa sempre limpinha e cheirosa e saber que existe um bom lugar para se chamar de lar, muito obrigada *Simone Lemes*.

À *Rafaela Benatti*, por ser a primeira a me receber em Campinas quando não conhecia ninguém e assim nascer uma grande amizade. Obrigada pela dedicação para realização desse trabalho, mas principalmente pelo o que vai ficar guardado para sempre no coração, as lembranças de uma amizade, das boas conversas, risadas, fofocas, bobagens, o apoio de cada dia, enfim, não existe distância quando a amizade é verdadeira.

As irmãs de coração, *Luana Rosa, Natasha Franco, Paloma Bruno e Tamara Sandoval* pela oportunidade de dividir cada momento da minha vida com vocês, de passar de menina para mulher ao lado de pessoas maravilhosas que fazem toda a diferença. Pelas boas risadas, momentos de alegrias, conselhos, pelos momentos que dividimos a mesma dor, a mesma lágrima e a mesma vontade de querer vencer e se tornar melhor. Amo vocês minhas eternas amigas.

Seria injusto da minha parte não agradecer a pessoa que mudou minha vida, que por muitas vezes me enxergou melhor do que eu sou. Que em nenhum momento me deixou desistir quando eu me sentia fraca, e sim me incentivou a cada dia, foi quem mais ouviu minhas histórias, enxugou minhas lágrimas e colocou um sorriso (*covinha*) no meu rosto quando me faltava. No entanto, foi a mesma pessoa que fez em apenas um dia com que eu quisesse jogar

tudo pro ar, mas as dificuldades surgem para gente ver que somos mais forte do que imaginamos ser. Independente de onde a vida nos levar, uma coisa nunca vai mudar, você sempre vai ser um presente de Deus para mim, e amor quando verdadeiro não muda, não acaba nem mesmo com o tempo, por isso não tenho vergonha de dizer que te amo *Lucas Souza*. *“Não coloque um ponto final nas suas esperanças. Ainda há muito o que fazer, ainda há muito o que plantar, e o que amar nessa vida.”* Pe. Fábio de Melo.

Aos *animais experimentais* por doarem suas vidas inocentemente para a realização desse trabalho.

Ao *PAPDIC/FAEPEX, FAPESP e CNPq*, pelo auxílio financeiro.

Àqueles que os nomes não foram citados, mas no coração estão gravados, afinal, ninguém passa em nossas vidas por acaso, cada um deixa um pouquinho de si, e mesmo que de forma indireta e sem perceber contribui na nossa trajetória.

À todos vocês meu muito obrigada!!!

“Procure a sabedoria e aprenda a escrever os capítulos mais importantes de sua história nos momentos mais difíceis de sua vida.”

Augusto Cury

RESUMO

É conhecido que a obesidade materna durante a gestação e lactação expõe a prole a condições inflamatórias e leva a distúrbios metabólicos e obesidade na vida adulta. Porém, não é conhecido se o evento celular relacionado aos danos da sinalização hipotalâmica, como o estresse de retículo endoplasmático (ERE) e resistência à insulina, poderia estar presente na prole. Para responder essa questão, nós avaliamos o tecido hipotalâmico e hepático em camundongos recém desmamados (d28) e o hipotálamo de camundongos recém nascidos (d0) de mães alimentadas com dieta rica em gordura (HFD-O) e dieta controle (SC-O) durante a gestação e lactação. Peso corpóreo, massa do tecido adiposo, e ingestão alimentar foram mais acentuados em camundongo HFD-O que em camundongo SC-O. Além disso, intolerância a glicose (GTT) e insulina (ITT) foram maior em HFD-O que em SC-O. Comparado com SC-O, os níveis de RNAm de IL1- β , expressão proteica de NF κ B e p-JNK no hipotálamo foram aumentados em HFD-O. Além disso, comparado ao SC-O, a fosforilação da AKT hipotalâmica após estímulo com insulina foi reduzida, enquanto os marcadores de ERE (p-PERK, p-eIF2 α , XBP1s, GRP78 e GRP94) foram aumentados no tecido hipotalâmico de HFD-O com d28 mas não com d0. A fosforilação hipotalâmica da AMPK estava aumentada em HFD-O comparado a SC-O com d28. Esses danos na sinalização hipotalâmica foram acompanhados de alterações hepáticas evidenciadas pelo aumento de depósito de triglicérides, ativação de proteínas pró-inflamatórias (NF κ B, p-IKK e p-JNK), e marcadores de ERE (p-PERK e p-eIF2 α). Esses resultados indicam fortemente que o período de lactação é importante para as mudanças metabólicas. Essas mudanças podem ocorrer precocemente na prole de mães obesas e contribuir para a obesidade e patologias associadas.

ABSTRACT

It is known that maternal obesity during pregnancy and lactation exposes offspring to inflammatory conditions and leads to metabolic disturbances and obesity in adult offspring. However, it is unknown whether the cellular events related to the damage to hypothalamus signaling, such as endoplasmic reticulum stress (ERS) and insulin resistance, could be present early in the offspring. To address this question, we evaluated the hypothalamic and hepatic tissues in recently weaned mice (d28) and the hypothalamus of newborn mice (d0) from dams fed HFD (HFD-O) or standard chow diet (SC-O) during pregnancy and lactation. Body weight, adipose tissue mass, and food intake were more accentuated in HFD-O mice than in SC-O mice. In addition, intolerance to glucose (GTT) and insulin (ITT) was higher in HFD-O mice than in SC-O mice. Compared with SC-O mice, levels of hypothalamic IL1- β mRNA, NF κ B protein, and p-JNK were increased in HFD-O mice. Furthermore, compared with SC-O mice, hypothalamic AKT phosphorylation after insulin challenge was reduced, while markers of ERS (p-PERK, p-eIF2 α , XBP1s, GRP78, and GRP94) were increased in the hypothalamic tissue of HFD-O at d28 but not at d0. Hypothalamic AMPK phosphorylation was higher in HFD-O mice than in SC-O mice at d28. These damages to hypothalamic signaling were accompanied by hepatic alterations evidenced by increased triglyceride deposits, activation of proinflammatory proteins (NF κ B, p-IKK, and p-JNK), and markers of ERS (p-PERK and p-eIF2 α). Taken together, these results strongly indicate that the lactation period is important for metabolic changes. These changes may occur early in offspring from obese dams and contribute to obesity and associated pathologies.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil-CoA carboxilase
ACTH	Hormônio adrenocorticoide
AgRP	Peptídeo relacionado ao <i>agouti</i>
AKT	Proteína quinase B
AMP	Monofosfato de adenosina
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ARC	Núcleo arqueado
ATF-6	<i>Activating transcription factor-6</i>
ATP	Trifosfato de adenosina
α -MSH	Hormônio estimulador α -melanocítico
Bip	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
Cart	Peptídeo regulado por cocaína e anfetamina
CaMKK	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase kinase
CCK	Colecistoquinina - 1
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DIO	Obesidade induzida por dieta
ERAD	<i>ER-associated protein degradation</i>
ERE	Estresse do Retículo Endoplasmático
eIF2 α	<i>Eukaryotic translation initiation factor2</i>
eIF2B	<i>Eukaryotic initiation factor 2B</i>

GRP78	Proteína regulada por glicose 78
GRP94	Proteína regulada por glicose 94
GLP-1	<i>Glucose-like peptide 1</i>
GTT	Teste de tolerância à glicose
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL1 β	Interleucina 1 'beta'
IKK	Quinase do inibidor kappa B
I κ B	Inibidor kappa B
IR	Receptor de insulina
IRS-1	Primeiro substrato do receptor de insulina
IRE-1	<i>Inositol-requiring enzyme-1</i>
ITT	Teste de tolerância à insulina
IMC	Índice de massa corpórea
JNK	Quinase c-Jun N-Terminal
LKB1	Liver kinase B1
NPY	Neuropeptídeo Y
NF κ B	Fator nuclear kappa B
ObRb	Receptor de leptina de forma longa
PC2	<i>Propotein convertase 2</i>
POMC	Pro-opiomelanocortina
PERK	<i>PKR-like ER-regulated kinase</i>

PBA	<i>Phenybutyric acid</i>
RE	Retículo endoplasmático
SNC	Sistema nervoso central
SREBP1c	<i>Sterol regulatory element-binding proteins 1c</i>
SREBP2	<i>Sterol regulatory element-binding proteins 2</i>
S1P	<i>Site-1 protease</i>
S2P	<i>Site-2 protease</i>
TNF α	Fator de necrose tumoral 'alfa'
TLR4	<i>Toll-like receptor 4</i>
TRAF-2	<i>TNF receptor- associated factor 2</i>
TUDCA	<i>Tauroursodeoxycholic acid</i>
UPR	<i>Unfolded protein response</i>
XBP1	<i>X-box binding protein-1</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de sinalização em resposta ao ERE – <i>unfolded protein response</i> (UPR)	26
---	----

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	18
Estresse de Retículo Endoplasmático.....	24
OBJETIVOS	29
Objetivo Geral	29
Objetivos Específicos.....	29
CAPÍTULO 1 – Artigo referente à tese	30
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	55
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXOS.....	72

INTRODUÇÃO

A obesidade é definida do ponto de vista clínico como um acúmulo excessivo de gordura em magnitude suficiente para produzir consequências adversas à saúde (Spiegelman & Flier, 2001; WHO, 2013). Além disso, outras doenças não transmissíveis estão associadas à obesidade, como doenças cardíacas, hipertensão, distúrbios do sono, alguns tipos de câncer e diabetes mellitus tipo 2 (Kopelman, 2000; WHO, 2013).

O sobrepeso e a obesidade resultam da interação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais. As principais causas do desenvolvimento dessa doença estão relacionadas com o aumento no consumo calórico e a diminuição do gasto energético ou a combinação de ambos, que leva a um balanço energético positivo e, consequentemente, um aumento no peso corpóreo na sociedade moderna (Stein & Colditz, 2004).

Dados obtidos por levantamentos epidemiológicos apontam que a obesidade mundial quase dobrou desde 1980, sendo que em 2008, 1,4 bilhão de indivíduos adultos apresentavam sobrepeso, índice de massa corpórea (IMC) superior a 25 kg/m^2 e cerca de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres eram clinicamente obesos ($\text{IMC} \geq 30 \text{ kg/m}^2$) (WHO, 2013). O aumento considerável na prevalência da obesidade tem sido melhor explicado por mudanças comportamentais e ambientais que a população tem experimentado em decorrência dos avanços tecnológicos (Kopelman, 2000).

As mudanças na prevalência de obesidade adulta são reflexos de um aumento no peso corpóreo na infância e adolescência em países industrializados e em desenvolvimento. O início precoce da obesidade leva a um aumento da probabilidade de desenvolver obesidade ao longo da vida (Kopelman, 2000). Historicamente, o conceito “maior é melhor” foi amplamente aceito, de tal modo que uma criança pesada significava uma criança saudável. Essa percepção mudou drasticamente com base na evidência de que a obesidade infantil está associada com uma grande variedade de complicações graves à saúde e um aumento do risco de doenças e de morte prematura na vida adulta (Onis et al. 2010).

Em 2010, estimava-se que 43 milhões de crianças já apresentavam algum grau de obesidade e 92 milhões estavam em risco de sobrepeso. A prevalência mundial de sobrepeso e

obesidade infantil aumentou de 4,2% em 1990 para 6,7% em 2010 e as projeções indicam em 2020 cerca de 60 milhões (9,1%) de crianças podem apresentar sobrepeso ou obesidade (Onis et al. 2010). Esta tendência é preocupante levando-se consideração que a obesidade na infância aumenta significativamente o risco de o adulto ser obeso.

Também deve-se destacar que entre mulheres a prevalência de obesidade durante a gestação tem aumentado, oferecendo riscos de desenvolver complicações, tanto para a mãe quanto para a criança (Drake & Reynolds, 2010). O crescimento e desenvolvimento no útero é um processo complexo em que interagem componentes materno e fetal e placentários, a fim de sustentar o crescimento fetal e a sobrevivência ao longo da gravidez (Warner & Ozanne, 2010).

Estudos têm demonstrado que essa crescente epidemia de obesidade e síndrome metabólica (diabetes tipo II, hipertensão, doenças cardiovasculares) podem ser “programadas” no início da vida (Warner & Ozanne, 2010). Isso porque o período de desenvolvimento pré e pós natal e o ambiente nutricional ao qual o indivíduo é exposto pode levar a adaptações metabólicas que continuarão a se expressar na vida adulta (Levin, 2006; Drake & Reynolds, 2010).

Tanto a restrição quanto o excesso de nutrientes durante a gestação e a lactação podem levar a obesidade na prole (Levin, 2006). Estudos indicam que filhos de mães desnutridas durante o período gestacional tiveram um aumento na incidência de obesidade e doenças cardiovasculares na vida adulta (Ravelli et al. 1976, Ravelli et al. 1999).

O indivíduo exposto a um ambiente intrauterino pobre em nutrientes desenvolve uma série de adaptações fisiológicas e metabólicas para sua sobrevivência pós-natal nas mesmas condições nutricionais (Warner & Ozanne, 2010). Entretanto, como demonstrado no estudo de Vickers et al. (2000), roedores gerados em um ambiente desnutrido, quando expostos a uma oferta de nutrição hipercalórica pós-natal desenvolvem anormalidades metabólicas durante a vida adulta, precipitando quadros de hipertensão, hiperinsulinemia, hiperleptinemia e obesidade.

Em contrapartida, crianças expostas a um ambiente com excesso de nutrientes no período pré-natal também apresentam risco aumentado de desenvolver obesidade

(Plagemann et al. 1997). Assim, o consumo materno de uma dieta rica em gordura durante o período de gestação e/ou lactação produz alterações metabólicas similares na fase adulta da prole, tais como hipertensão, hiperfagia, hiperinsulinemia além do aumento na adiposidade (Khan et al. 2003; Khan et al. 2005; Samuelsson et al. 2008; Nivoit et al. 2009). Neste contexto, a nutrição materna parece ter papel pontual se analisarmos que, segundo Howie et al. (2009), filhos de mães que fizeram uso de uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação ou de mães que desde o desmame consumiram dieta rica em gordura são hiperinsulinêmicos, hiperleptinêmicos apresentam uma predisposição a desenvolver obesidade na fase adulta independente da dieta pós-desmame.

Em um estudo com primatas não humanos, McCurdy et al. (2009) avaliaram a prole de mães que fizeram uso de uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação e observaram aumento nos níveis de triglicérides hepático e o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA). Esse mesmo perfil de anormalidades hepáticas foi observado em roedores que apresentaram ainda resistência à insulina e ativação de vias inflamatórias como consequência de um ambiente intra-uterino obesogênico (Ashino et al. 2012).

Além das alterações periféricas, alguns estudos demonstram que a dieta hiperlipídica pode comprometer a funcionalidade neuronal e promover alterações no sistema que regula o balanço energético, contribuindo para o desenvolvimento da obesidade (Breton, 2013). A manutenção do peso corpóreo é decorrente da resposta ao balanço energético no sistema nervoso central (SNC), que ocorre principalmente em uma região do cérebro denominada hipotálamo (Velloso, 2005). O hipotálamo responde a diferentes fatores periféricos e centrais, incluindo hormônios e neuropeptídeos, como a grelina, *glucose-like peptide 1* (GLP-1), colecistoquinina-1 (CCK), insulina e leptina que regulam a ingestão alimentar, homeostase da glicose e energética (Wynne et al. 2005; Willians & Elmquist, 2012). Os hormônios leptina (derivado do tecido adiposo) e insulina (derivado das células β pancreáticas) são os principais reguladores do controle energético no SNC. Eles se ligam em seus receptores ObRb e IR,

respectivamente, que encontra-se expressos em maior proporção em neurônios do núcleo arqueado hipotalâmico, atuando em vias de sinalização que regulam a transcrição gênica de neurotransmissores (Velloso, 2005).

O núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) possui duas subpopulações de neurônios, uma que expressa neuropeptídeos orexigênicos, neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado ao *agouti* (AgRP), e outra que expressa neuropeptídeos anorexigênicos conhecidos como pro-opiomelanocortina (POMC), que secreta o hormônio estimulador α -melanocítico (α -MSH), e o peptídeo regulado por cocaína e anfetamina (CART), que são responsáveis pelo sinal da fome e saciedade, respectivamente (Velloso, 2005, Wynne et al, 2005). Em situações de baixos níveis de leptina e insulina, no caso do jejum, os receptores hipotalâmicos encontram-se desocupados e ativam neurônios que expressam NPY/AgRP que transmitem sinais e promovem o aumento da fome e diminuição da termogênese (Schwartz et al. 2000; Velloso, 2005). Por outro lado, em condições que levam ao aumento na concentração de leptina e insulina na corrente sanguínea, a sinalização desses hormônios no núcleo arqueado do hipotálamo promove a ativação de neurônios que expressam neuropeptídeos anorexigênicos como POMC/CART, resultando em uma diminuição da fome e aumento da termogênese (Schwartz et al. 2000; Flier, 2004; Velloso, 2005).

No hipotálamo, os mecanismos de controle da homeostase energética são redundantes. Embora, a sinalização hormonal, como descrita anteriormente, seja um importante mecanismo, os neurônios também respondem a disponibilidade de nutrientes. Um importante sensor intracelular responsável por manter o equilíbrio energético é a proteína quinase ativada por AMP (AMPK), sua atividade é regulada pela razão AMP/ATP (Lopaschuk et al. 2010) e por fosforilação promovida por quinases, tais como LKB1 e CaMKK (Hardie, 2003).

A AMPK regula o balanço energético por responder a sinais hormonais e nutricionais tanto em tecidos periféricos quanto no SNC, que leva a mudanças na homeostase energética em todo o corpo (Lage et al. 2008; Lopaschuk et al. 2010). No músculo esquelético, a ativação da AMPK resulta na oxidação de ácidos graxos e captação de glicose. Inversamente, no tecido hepático a atividade da AMPK inibe a síntese de ácidos graxos e colesterol e suprime a produção de glicose (Khan et al 2005; Lage et al. 2008).

A modulação da atividade da AMPK no hipotálamo está envolvida na alteração da ingestão alimentar e o peso corpóreo (Minokoshi et al. 2004). Assim, a AMPK fosforila e inativa a proteína acetil-CoA carboxilase (ACC), enzima responsável pela carboxilação de acetil-CoA à malonil-CoA, um intermediário crítico do metabolismo de ácidos graxos e importante sinalizador anorexigênico (Lopaschuk et al. 2010).

Como demonstrado por Andersson et al. (2004), a ativação farmacológica de AMPK, leva a inibição de ACC e diminuição dos níveis de malonil-CoA no hipotálamo, promovendo o aumento dos sinais orexigênicos e da ingestão alimentar. Assim como, a inibição da ACC hipotalâmica modula positivamente a produção de glicose hepática e ingestão alimentar (Kinote et al. 2012; Ikegami et al. 2013; Santos et al. 2013).

No entanto, falhas no sistema de controle da homeostase energética podem contribuir para a perda dos sinais anorexigênicos favorecendo o aumento do peso corpóreo (Velloso, 2005). Neste sentido o fácil acesso a dieta rica em gordura cria condições que afetam a função do hipotálamo e essas alterações têm sido observadas desde o início do desenvolvimento.

Estudos mostram que prole de mães obesas apresenta hiperleptinemia, alteração na expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos (aumento de NPY) e respostas orexigênicas inadequadas no período de jejum, o que pode levar ao surgimento de hiperfagia (Chen & Morris, 2009). Além disso, observa-se um aumento na expressão de outros peptídeos orexigênicos, principalmente galanina, encefalina, dinorfina e orexina que são responsáveis pela preferência por gordura na dieta (Chang et al. 2008), contribuindo para um fenótipo obeso.

O consumo de dietas hiperlipídicas também tem sido relacionado a uma inflamação crônica, de baixo grau que atinge de maneira tempo-dependente diferentes tecidos corporais.

No hipotálamo, roedores que se alimentam de dietas ricas em gordura, especialmente saturada, exibem aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas o fator de necrose tumoral α (TNF α), a interleucina 1 β (IL1- β) e a interleucina 6 (IL-6) (De Souza et al. 2005; Milanski et al. 2009; Moraes et al. 2009). Estas condições tem sido relacionadas a uma resistência central à ação da insulina através da ativação de serinas quinases, como a quinase c-Jun N-terminal (JNK), quinase do inibidor kappa B (IKK), responsáveis por fosforilar em serina elementos importantes desta via, como o substrato do receptor da insulina 1 (IRS1), resultando em menor fosforilação da proteína quinase B (AKT) e consequentemente menor propagação do sinal desse hormônio (Shoelson et al. 2006, Luca & Olefsky, 2009).

Adicionalmente, a IKK está envolvida na ativação transcripcional do fator nuclear kappa (NF κ B), através da fosforilação do inibidor kappa B (I κ B), um inibidor citoplasmático de NF κ B, seguido de degradação via proteassoma e liberação de NF κ B. Uma vez no núcleo, o NF κ B é responsável por induzir a transcrição de genes envolvidos na inflamação, resposta imune e apoptose (Hayden & Ghosh, 2004; Oeckinghaus & Ghosh, 2009).

Curiosamente, estes efeitos inflamatórios têm sido observados mais precocemente em prole recém desmamada de mães obesas. O consumo materno de uma dieta rica em gordura contribuiu para o aumento da resposta inflamatória hipotalâmica, com ativação das serinas quinases JNK e IKK, menor atividade da AKT e sensibilidade a insulina (Rother et al. 2012). De maneira similar a ativação de proteínas envolvidas na via inflamatória também foi observada no fígado de prole de mães obesas na idade adulta (McCurdy et al. 2009, Ashino et al. 2012).

Estudos realizados por Charlier et al. (2008) e Shankar et al. (2011) mostram que a obesidade durante a gravidez gera um ambiente pró-inflamatório na placenta. De acordo com Charlier et al. (2008), o ambiente uterino de mães obesas apresenta um estado inflamatório aumentado, com acúmulo de macrófagos na placenta e elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL-6, IL-1). Interessantemente, o consumo de uma dieta rica em gordura durante a gestação, contribui para um acúmulo ectópico de lipídeos no útero, acarretando em uma inflamação precoce neste tecido e em blastocistos (Shankar et al. 2011). Esse ambiente inflamatório onde o feto se desenvolve pode precipitar distúrbios metabólicos para a prole na vida adulta.

Dentre os diferentes mecanismos associados à ativação de vias pró-inflamatórias na obesidade induzida por dieta, a indução de estresse de retículo endoplasmático (ERE) e ativação do sistema imune inato através da sinalização de *toll-like receptor 4* (TLR4) (Milanski et al. 2009; Pierre et al. 2013) tem sido amplamente investigado. Ambos os mecanismos resultam em ativação da via IKK β /NF κ B no hipotálamo (Zhang et al. 2008; Milanski et al. 2009).

Estresse de Retículo Endoplasmático

O retículo endoplasmático (RE) é uma organela responsável pelo armazenamento de Ca²⁺, biossíntese de lipídeos, síntese e maturação de proteínas secretoras e de membranas (Cnop et al. 2011; Hotamisligil, 2010a). Esta organela possui um papel importante no processo de maturação de proteínas recém-sintetizadas, que inclui clivagem, glicosilação, formação de pontes dissulfetos e dobramento correto, para que sejam transportadas ao aparelho de Golgi (Gotoh et al. 2011; Yoshida, 2006).

As proteínas recém-sintetizadas são dobradas e processadas com a ajuda de chaperonas, localizadas no retículo endoplasmático, tais como, *binding immunoglobulin protein* (BiP), proteína regulada por glicose 94 (GRP94), calnexina entre outras (Gotoh et al. 2011). Essas chaperonas exercem nas células um sistema de controle de qualidade, reconhecendo e encaminhando as proteínas não estáveis para a degradação (Yoshida, 2006; Hotamisligil, 2010a). Proteínas mal-formadas são retidas do RE, translocadas para o citoplasma pela maquinaria de degradação associado ao RE (ERAD) e degradadas pelo proteossoma. Quando são secretadas em quantidades que excedem a capacidade de processamento e da maquinaria da ERAD, as proteínas mal-formadas se acumulam no lúmen do retículo endoplasmático (Yoshida, 2006).

Nessas situações o retículo endoplasmático percebe um ambiente celular “estressante” ou “estressor” que inclui, além do acúmulo de proteínas mal-formadas, a privação de nutrientes, infecções, excesso de lipídeos, aumento da síntese e secreção de proteínas e desequilíbrio dos níveis de cálcio que caracterizam o estresse de retículo

endoplasmático. A partir de ponto uma resposta celular conhecida como *unfolded protein response* (UPR) (Kaufman et al. 2002; Ozcan et al. 2004) é ativada. Esta resposta tem como principal objetivo preservar a integridade celular enquanto persiste a condição de estresse.

Dessa forma, a UPR vai diminuir a carga de proteínas mal-formadas e restaurar a homeostase celular através da redução da tradução de uma considerável parcela das proteínas processadas pelo retículo endoplasmático e induz a transcrição de moléculas envolvidas no processamento de proteínas, *N*-glicosilação, ERAD e controle de qualidade (Cnop et al. 2011). A UPR é desencadeada a partir da ativação de três proteínas localizadas na membrana do retículo endoplasmático, conhecidas como *inositol-requiring enzyme-1* (IRE-1), *PKR-like ER-regulated kinase* (PERK) e *activating transcription factor-6* (ATF-6) (Hummasti & Hotamisligil, 2010). Em condições normais a proteína regulada por glicose 78 (GRP78), uma chaperona conhecida como Bip, se liga ao domínio amino-terminal de IRE-1 e PERK e ao domínio carboxi-terminal da ATF-6, mantendo-as inativas. No entanto, o acúmulo de proteínas mal-formadas no lúmen do retículo endoplasmático leva ao recrutamento de GRP78 que se desconecta e libera as proteínas transmembranas que são sensores de UPR, tornando-as ativas (Cnop et al. 2011, Hotamisligil, 2010a).

A PERK é ativada através de oligomerização e transfosforilação, uma vez ativa, fosforila (em serina 51) e inibe a subunidade α do *eukaryotic translation initiation factor 2* (eIF2 α), que compete com o complexo *eukaryotic initiation factor 2B* (eIF2B), reduzindo a taxa de formação do complexo ternário, resultando na atenuação da síntese de proteínas e uma subsequente redução da carga de trabalho do RE (Yoshida, 2006; Hotamisligil, 2010a; Cnop et al. 2011).

A ativação de IRE1 resulta na conversão do RNA mensageiro imaturo (pré-RNA_m) da proteína *X-box binding protein-1* (XBP-1), em RNA mensageiro maduro, por um mecanismo não convencional de *splicing* (Yoshida, 2006). O produto dessa reação, XBP1s, regula a expressão de genes envolvidos na ERAD e na produção de chaperonas, como GRP78 além de induzir a expressão de proteínas envolvidas na biogênese do RE (Hummasti & Hotamisligil, 2010; Cnop et al. 2011; Hetz et al. 2011).

O ATF-6 é translocado para o Golgi, onde sofre clivagem por atividade das enzimas *site-1 protease* (S1P) e *site-2 protease* (S2P), produzindo um fator de transcrição ativo que se transloca para o núcleo e ativa a produção de chaperonas e interage com a via do IRE-1 regulando a expressão do RNAm do XBP-1, além de interagir diretamente com a proteína XBP-1 e exercer o controle de qualidade da UPR. Assim, a ativação destas três vias deve reverter o efeito do ERE e reestabelecer a homeostase celular (Figura 1). No entanto, a presença de um estímulo estressor crônico pode levar ao comprometimento da funcionalidade da célula e ativar proteínas que desencadeiam a morte por apoptose (Hotamisligil, 2010a; Hetz, 2012).

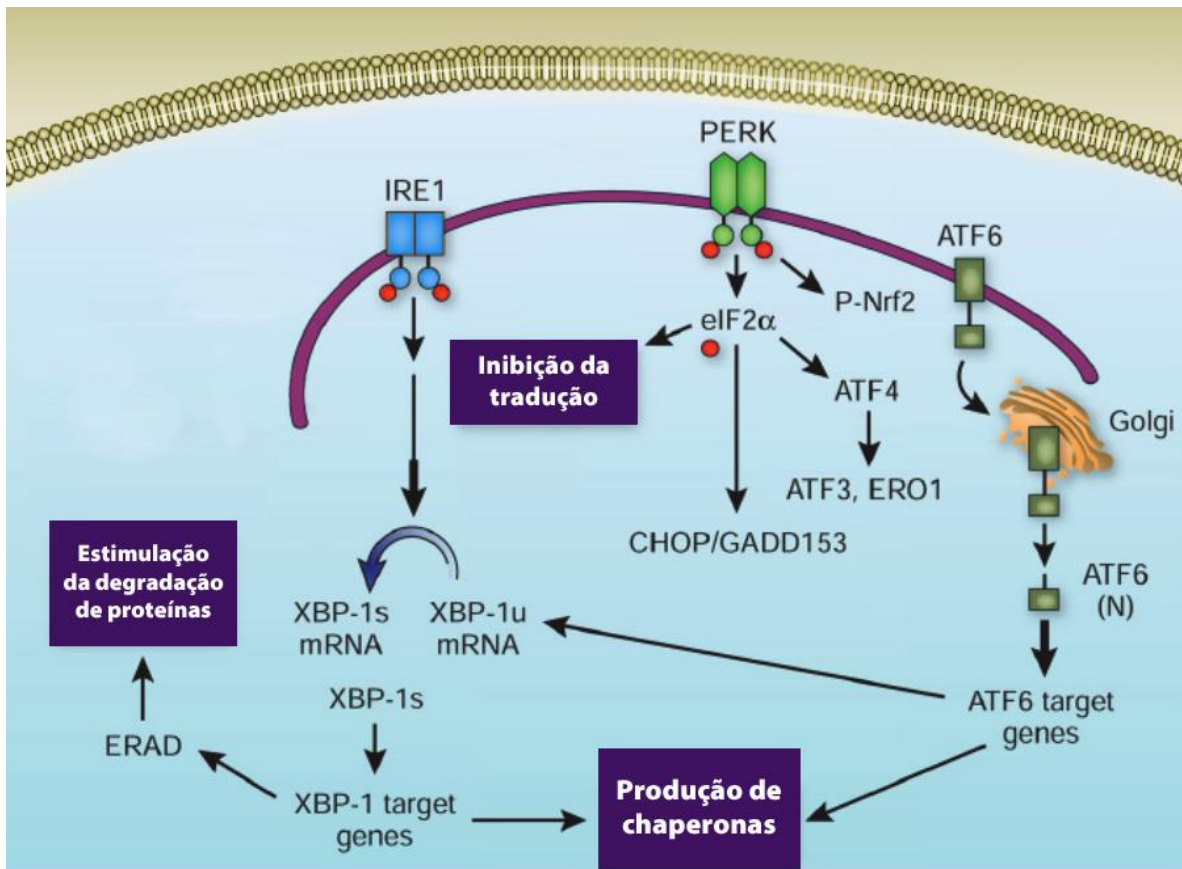


Figura 1: Via de sinalização em resposta ao ERE – *unfolded protein response* (UPR)

(Adaptado: Hotamisligil G.S. Nature Medicine, 2010b)

Tem sido demonstrado que o ERE leva ativação de proteínas pró-inflamatórias (JNK e IKK) que interferem na sinalização da insulina. A ativação da serina quinase JNK durante o ERE ocorre através da formação do complexo IRE1 α -TRAF2 (TRAF2: *TNF receptor- associated factor 2*) que induz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (Hummasti & Hotamisligil, 2010; Hetz, 2012).

Durante o ERE a via IKK/NF κ B pode ser ativada pelas três vias de sinalização da UPR (PERK, IRE1, ATF6). Inicialmente através do complexo IRE1 α -TRAF2, que mantém uma atividade basal da IKK suficiente para ativar NF κ B; pela PERK, através da atenuação da tradução protéica e consequente redução do I κ B, resultando na translocação e ativação transcripcional no núcleo (Tam et al. 2012); e pelo ATF6 que regula a atividade de NF κ B (Boden, 2009; Hummasti & Hotamisligil, 2010; Hotamisligil, 2010a).

Muitas das condições que desencadeiam o ERE são encontradas na obesidade, tais como o aumento na demanda da maquinaria de síntese celular, excesso de lipídeos e disponibilidade de nutrientes. Ozcan et al. (2004) foram os primeiros a demonstrar a relação do ERE com a resistência à insulina em tecidos periféricos de animais obesos. O tecido adiposo e hepático de animais com obesidade induzida por dieta ou por alteração genética (*ob/ob*) os marcadores de ERE estão aumentados, comprometendo a sinalização da insulina mediada pela JNK. No entanto, o tratamento farmacológico com chaperonas químicas (PBA e TUDCA) reduz o ERE em tecidos periféricos (fígado e adiposo) e restaura a homeostase da glicose em modelo de animais com modificação genética (*ob/ob*) (Ozcan et al. 2006). Além disso, indivíduos obesos submetidos à cirurgia bariátrica apresentaram redução de marcadores da via do ERE tanto no tecido hepático, quanto adiposo, mostrando uma íntima relação entre a perda de peso corpóreo com a melhora na sensibilidade à insulina e diminuição de vias de estresse (Gregor et al. 2009).

No SNC o consumo de uma dieta rica em gordura acarretou no aumento de marcadores de estresse de retículo endoplasmático (GRP78, CHOP, IRE1, JNK) no hipotálamo e consequente redução na resposta anorexigênica à leptina. O mesmo estudo demonstrou que a indução química (tapsigargina) de ERE no hipotálamo promoveu perda no sinal da leptina e insulina, contribuindo para o aumento da ingestão calórica e ganho de peso (Won et al. 2009).

Dessa forma, a ativação crônica e central de UPR acarreta na ativação de vias inflamatórias (JNK e IKK), mecanismo envolvido na inibição da propagação do sinal da insulina, sugerindo ser um importante mediador no desenvolvimento de resistência a insulina e desordens metabólicas observadas em indivíduos obesos (Ozcan et al. 2004; Gregor et al. 2009; Won et al. 2009).

Cakir et al. (2013) demonstraram que a obesidade induzida por dieta (DIO), induz ERE no hipotálamo, especificamente na região do ARC, e que este poderia ser um mecanismo importante envolvido no desequilíbrio energético. Neste estudo a DIO não afetou os níveis de RNAm de POMC mas alterou o processamento pós-traducional desse neuropeptídeo, e este mecanismo pode ser dependente da diminuição da atividade de *proprotein convertase 2* (PC2), enzima chave envolvida na conversão de ACTH à α -MSH.

Os mecanismos moleculares envolvidos na indução de ERE não estão bem esclarecidos. Recentemente, um estudo realizado por Otda et al. (2013) pontuou a disfunção no proteassoma, processo essencial para a degradação de proteínas mal-formadas na maquinaria do ERAD, como possível evento que medeia o desenvolvimento de ERE e resistência hepática à insulina induzida por dieta, concomitantemente contribuindo para o aumento de esteatose hepática em animais obesos.

Segundo Li et al. (2012), o consumo contínuo de uma dieta rica em gordura materna em diferentes gerações, agrava de maneira gradual o desenvolvimento de resistência à insulina e obesidade na prole, este evento foi acompanhado pela presença de marcadores de ERE no fígado e de NAFLD, sugerindo que o consumo nutricional inadequado durante períodos críticos do desenvolvimento pode levar a mudanças epigenéticas com o passar das gerações.

Tendo em vista os danos causados pelo estresse de retículo endoplasmático e as vias pró-inflamatórias na sinalização celular, nossa hipótese de trabalho é que o ambiente obesogênico materno durante o desenvolvimento fetal, pode levar ao estresse de retículo endoplasmático e um perfil pró-inflamatório que ativam precocemente as vias associadas a UPR no hipotálamo, promovendo distúrbios metabólicos que podem levar a obesidade na fase adulta.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a ativação de proteínas relacionadas ao ERE e vias inflamatórias no hipotálamo e fígado de prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Objetivos específicos

- Avaliar a evolução do peso corporal do nascimento aos 28 dias de vida na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Verificar a massa de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Verificar a homeostase da glicose por meios dos testes de tolerância à glicose e à insulina na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Analisar a expressão e atividade de proteínas envolvidas no ERE no hipotálamo de camundongos recém-nascidos (d0) de mães com obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Analisar no tecido hepático e hipotalâmico a expressão e atividade de proteínas envolvidas no ERE na prole pós-desmame (d28) de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Verificar o consumo alimentar na prole pós-desmame de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica;
- Verificar o conteúdo de triglicérides hepático vida na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica

CAPÍTULO 1

Artigo Científico

Endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring from obese mice

Melo, A.M.¹; Benatti, R.O.¹; Ignacio-Souza, L.M.²; Okino, C.¹; Torsoni, A.S.¹; Milanski, M.¹; Velloso, L.A.³; Torsoni, M.A.^{1*}

¹Laboratory of Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Limeira, São Paulo, Brasil

²Faculdade de Nutrição, Universidade Federal do Mato Grosso-UFMT, Cuiabá, Mato Grosso, Brasil

³Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil

Running title: Metabolic stress in offspring from obese dams

Key words: Endoplasmic reticulum stress, hypothalamus, maternal imprinting, obese mice, high-fat diet

Word count: 3,755

*Correspondence address:

Marcio A. Torsoni

Faculdade de Ciências Aplicadas

Universidade de Campinas

Rua Pedro Zaccaria, 1300

Jardim Santa Luiza

Limeira-São Paulo

CEP 13484350

Phone: 55 19 3701 6705

Fax: 55 19 3701 6680

E-mail: marcio.torsoni@fca.unicamp.br

Abstract

It is known that maternal obesity during pregnancy and lactation exposes offspring to inflammatory conditions and leads to metabolic disturbances and obesity in adult offspring. However, it is unknown whether the cellular events related to the damage to hypothalamus signaling, such as endoplasmic reticulum stress (ERS) and insulin resistance, could be present early in the offspring. To address this question, we evaluated the hypothalamic and hepatic tissues in recently weaned mice (d28) and the hypothalamus of newborn mice (d0) from dams fed HFD (HFD-O) or standard chow diet (SC-O) during pregnancy and lactation. Body weight, adipose tissue mass, and food intake were more accentuated in HFD-O mice than in SC-O mice. In addition, intolerance to glucose (GTT) and insulin (ITT) was higher in HFD-O mice than in SC-O mice. Compared with SC-O mice, levels of hypothalamic IL1- β mRNA, NF κ B protein, and p-JNK were increased in HFD-O mice. Furthermore, compared with SC-O mice, hypothalamic AKT phosphorylation after insulin challenge was reduced, while markers of ERS (p-PERK, p-eIF2 α , XBP1s, GRP78, and GRP94) were increased in the hypothalamic tissue of HFD-O at d28 but not at d0. Hypothalamic AMPK phosphorylation was higher in HFD-O mice than in SC-O mice at d28. These damages to hypothalamic signaling were accompanied by hepatic damage evidenced by increased triglyceride deposits, activation of proinflammatory proteins (NF κ B, p-IKK, and p-JNK), and markers of ERS (p-PERK and p-eIF2 α). Taken together, these results strongly indicate that the lactation period is important for metabolic changes. These changes may occur early in offspring from obese dams and contribute to obesity and associated pathologies.

Introduction

Obesity is associated with the activation of inflammatory pathways and increased TNF α and IL1- β cytokine expression in different tissues. It is known that proinflammatory cytokines activate serine kinases c-Jun N-terminal kinases (JNK) and inhibitor of kappa B kinase (IKK) (Baud et al., 1999; Chu et al., 1999), and the association between inflammatory pathway activation and insulin and leptin resistance has been extensively reviewed (Saltiel 2012). In models of diet-induced obesity (DIO), the consumption of a high-fat diet (HFD) induces an increase in cytokine expression, JNK and IKK activation in the liver and the hypothalamus (Barbuio et al., 2007; Cai et al., 2005; De Souza et al., 2005), hepatic glucose production, and insulin resistance (Lalli et al., 2008; Melo et al., 2011). Furthermore, diet-induced inflammation can lead to the activation of apoptotic signaling pathways and to increased cell apoptosis death in hypothalamic neurons (McNay et al., 2012; Moraes et al., 2009).

Maternal consumption of HFD during pregnancy and lactation clearly affects the brain. Offspring from HFD dams have increased mRNA levels of neuropeptide Y and agouti-related polypeptide in the hypothalamus, indicating that orexigenic neuropeptides in HFD progeny are upregulated. In addition, serum leptin and insulin levels were higher in HFD offspring than in control rats (Gupta et al., 2009). Finally, adult offspring from HFD dams showed hepatic insulin resistance, hepatic fat deposition, and JNK and IKK activation (Ashino et al., 2012). Recently Shankar et al. showed that inflammatory signals were present in the uterus and the blastocyst, suggesting the early activation of the inflammatory pathways in offspring from HFD dams (Shankar et al., 2011).

The endoplasmic reticulum (ER) is the major site in the cell for protein folding and trafficking. The increase in the cellular demand for new molecules results in unfolded protein and ER stress (ERS) (Hotamisligil 2010). Consequently, proteins such as inositol requiring-1 (IRE1), PKR-like ER kinase (PERK), and activating transcription factor 6 (ATF6) are activated to promote the molecular adaptation to stress conditions. This response is known as the unfolded protein response (UPR), which has intersection with the inflammatory signaling pathway (Hotamisligil 2010; Ryan et al., 2012).

Hypothalamic inflammation and ERS can reportedly impair pancreatic islet function, lipid metabolism, central and peripheral insulin/leptin action, and blood pressure (Calegari et al., 2011; Purkayastha et al., 2011; Won et al., 2009; Zhou et al., 2012). On the other hand, the inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver, leading to reduced steatosis and reduced gluconeogenesis; however, these were abrogated by vagotomy (Milanski et al., 2012).

Although many studies have investigated the effects of maternal consumption of HFD on metabolic disorders in offspring, hypothalamic UPR activation in recently weaned mice remains unknown. To address this, 4-week-old and newborn pups from HFD and control dams were evaluated.

Material and methods

Animals and diets

This study was conducted in strict accordance with the recommendations of the COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) guidelines, approved by the Ethical Committee for Animal Use (ECAU) (ID protocol: 2758-1) of the Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil. Ten virgin female Swiss mice were taken from the university's central breeding colony. Before mating, the females were randomly divided into 2 groups and fed either HFD or standard chow (SC) (Table I) *ad libitum* for 3 weeks to allow adaptation. Mating was performed by housing females with adult males overnight, and pregnancy was confirmed by examining vaginal smears for the presence of sperm. Pregnant females were maintained in individual cages in a room at $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m. They were fed a specific diet (HFD or SC) and water *ad libitum* during the pregnancy and lactation periods. On the first day (d) after birth (d0), the litter size of both the groups was adjusted to 6 animals per litter. After weaning, only male offspring from HFD dams (HFD-O) and offspring from SC dams (SC-O) were fed with the SC diet until 28 days (d28).

Glucose tolerance test (GTT) and insulin tolerance test (ITT)

The intraperitoneal GTT was performed after fasting the mice overnight (d28). After collection of an unchallenged sample (time 0), 25% (w/v) glucose solution (2.0 g/body weight mass) was administered into the peritoneal cavity, and tail blood samples were collected at 15, 30, 60, 90, and 120 min after glucose administration. For ITT, insulin (0.5 U/body weight mass) was

administered by intraperitoneal injection, and tail blood samples were collected at 0 (immediately before insulin injection), 3, 6, 9, and 12 min after insulin administration in fasted mice (d28). The constant for glucose disappearance rate during the test (Kitt) was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$. The glucose $t_{1/2}$ was calculated from the slope of least-square analysis of the plasma glucose concentration during the linear decay phase. The glucose was determined through an Accu-Chek Performa glucometer.

Measurements of food intake

Mice (d28) were individually housed in metabolic cages before experimentation for acclimatization. The animals were given a preweighed amount of food, and food intake was recorded 24 h after refeeding.

Tissue extraction and immunoblotting

Tissue samples (d0 and d28) were obtained and homogenized in freshly prepared ice cold buffer [1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mol L⁻¹ Tris, pH 7.4, 0.1 mol L⁻¹ sodium pyrophosphate, 0.1 mol L⁻¹ sodium fluoride, 0.01 mol L⁻¹ EDTA, 0.01 mol L⁻¹ sodium vanadate, 0.002 mol L⁻¹ PMSF, and 0.01 mg aprotinin/mL]. The insoluble material was removed by centrifugation (10 000 ×g) for 25 min at 4°C. The protein concentration in the supernatant was determined using the Bradford dye-binding method. The supernatant was resuspended in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min before separation by SDS-PAGE using a miniature slab gel apparatus (Bio Rad, Richmond, CA, USA). Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose was

performed for 90 min at 120 V (constant). The nitrocellulose blots were probed with specific antibodies. Phospho-JNK, phospho-AKT, phospho-IKK, 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78), 94 kDa glucose-regulated protein GRP94, nuclear factor- κ B (NF κ B)p65, and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Phospho-PERK, total-AMPK (5' AMP-activated protein kinase), and phospho-AMPK, total ACC (acetyl-CoA carboxylase) were obtained from Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA). In addition, β -actin, XBP1s, and phospho-eIF2 α (Eukaryotic Initiation Factor 2 α) were obtained from Abcam (Cambridge, MA). Subsequently the blots were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (KPL, Gaithersburg, MD, USA). When necessary, a bolus injection of saline or regular insulin (300 U/body weight mass) through the abdominal cava vein was given, following which hypothalamic fragments were excised and immediately homogenized. The results were visualized by an autoradiograph with preflashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software, ScionCorp, MD, USA), and the intensities of the bands were normalized to those of total protein or the loading control GAPDH or β -actin.

Real-time PCR analysis

Hypothalamic total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen Corporation, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was rendered genomic DNA-free by digestion with RNase-free DNase (RQ1, Promega, Madison, WI, USA). Reverse transcription was performed using total RNA from hypothalamic samples. Real-time PCR

analysis of gene expression was performed in an ABI Prism 7500 Fast sequence detection system (Applied Biosystems). The primers used were obtained from Applied Biosystems: TNF- α (Mm00443258_m1), IL-10 (Mm01288386_m1), and IL-1 β (Mm00434228_m1). The optimal cDNA and primer concentrations as well as the maximum efficiency of amplification were obtained through 5-point, 2-fold dilution curve analysis for each gene. Each PCR contained 20 ng of reverse-transcribed RNA and was run according to the manufacturer's recommendation using the TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems). Target mRNA expression was normalized to β -actin expression and expressed as a relative value using the comparative threshold cycle (Ct) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) according to the manufacturer's instructions.

Biochemical measurements

To evaluate triglycerides frozen tissues (200 mg) from SC-O and HFD-O mice (d28) were homogenized in phosphate-buffered saline. After centrifugation, the protein concentration of the homogenate was determined, and an aliquot of 400 μ L was extracted with 5 mL of chloroform/methanol (2:1) and 0.5 mL 0.1% sulfuric acid. An aliquot of the organic phase was collected, dried under nitrogen, and resuspended in 2% Triton X-100 (Carr et al., 1993; Newberry et al., 2003). The hepatic triglyceride content was determined using a L- α -glycerol phosphate oxidase kit (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as the mean $\pm$ SE of the indicated number of experiments. Blot results are presented as direct band comparisons in autoradiographs and quantified by

densitometry using the Scion Image software (ScionCorp). Student's t-tests of unpaired samples and analysis of variance (ANOVA) for multiple comparisons were used. A post-hoc test (Tukey) was employed for determining a significance level of $p < 0.05$.

Results

Initially, the body weight at birth was evaluated (d0). As shown in Fig. 1A, SC-O mice showed higher body weights (5%) than HFD-O mice. At d0, all pups (female and male) were considered for body weight evaluation. From d7, only males were used in the analysis. From d14 to d21 after birth, HFD-O mice were significantly heavier (approximately 1.2-fold) than SC-O mice (Fig. 1B). In addition, HFD-O mice showed increased epididymal (3.1-fold) and retroperitoneal (3.0-fold) fat pads compared with SC-O mice (Fig. 1C). Furthermore, food intake was slightly higher in the HFD-O mice than in the SC-O mice (1.1-fold) (Fig. 1D). Following this, glucose homeostasis was evaluated through ITT and GTT, and both tests showed that maternal consumption of HFD during pregnancy and lactation resulted in glucose intolerance in the offspring (Fig. 1E and F).

Hypothalamic gene expression of cytokines was evaluated. The mRNA level of IL1- β cytokine was higher in HFD-O mice than in SC-O mice (4.5-fold); however, hypothalamic IL-10 and TNF α mRNA levels did not differ between HFD-O and SC-O mice (Fig. 2A, B, and C). Furthermore, compared with SC-O mice, hypothalamic NF κ Bp65 expression and JNK phosphorylation were increased (2.2-fold for both proteins) in HFD-O mice (Fig. 2D and E).

To evaluate ERS and UPR activation in the hypothalamus of HFD-O mice, the phosphorylation of PERK and eIF2 α proteins was measured. As shown in Fig. 3A and B, PERK and eIF2 α

phosphorylation was more accentuated in the hypothalamus of HFD-O mice than in the hypothalamus of SC-O mice (1.4-fold and 2.1-fold respectively). Furthermore, compared with SC-O mice, the hypothalamic expression of GRP94, GRP78 and XBP1s proteins was increased in HFD-O mice (3.3-fold, 2.7-fold, and 2.2-fold, respectively) (Fig. 3C, D, and E, respectively). However, the expression of GRP78, GRP94, and NFκBp65 did not differ in the hypothalamic tissue from newborn (d0) SC-O and HFD-O mice. Similarly, the level of p-JNK and p-eIF2α was not affected by HFD feeding during gestation (Fig. 3F).

Hypothalamic AKT phosphorylation was evaluated after insulin challenge (cava vein). As shown in Fig. 4A, hypothalamic AKT phosphorylation significantly increased (2.1-fold) after insulin administration in SC-O. However, in HFD-O mice, hypothalamic AKT phosphorylation did not change significantly after insulin challenge (Fig. 4A). The hypothalamic action of insulin modulates both glucose production and food intake, and the acetyl-CoA carboxylase (ACC) protein plays an important role in both processes (Santos et al., 2013). Interestingly, hypothalamic ACC and AMPK expression was more pronounced in HFD-O mice than in SC-O mice (3.5 fold and 1.8-fold, respectively) (Fig. 4B and C, respectively). Furthermore, AMPK (1.6-fold) phosphorylation was higher in HFD-O mice than in SC-O mice (Fig. 4D).

Because hypothalamic inflammation leads to defective regulation of energy homeostasis (Milanski et al., 2012) the proinflammatory pathway and UPR signals in the liver were investigated (d28). As shown in Fig. 5, hepatic IKK and JNK phosphorylation and NFκBp65 expression were higher in HFD-O mice than in SC-O mice (2.6-fold, 3.3-fold, and 2.4-fold respectively) (Fig. 5A, B, and C). Furthermore, hepatic PERK and eIF2α phosphorylation in HFD-

O mice was more pronounced than that in SC-O mice (Fig. 5D and E). The hepatic triglyceride content was 49% higher in HFD-O mice than in SC-O mice (Fig. 5F).

Discussion

It is known that HFDs promote the activation of proinflammatory pathways in the hypothalamus and liver and increase serum TNF α and IL1- β levels (Barbuio et al., 2007; De Souza et al., 2005; Yuan et al., 2001). Recent studies have shown that the proinflammatory pathway involving IKK β and the downstream NF κ B are involved in controlling cell survival, growth, apoptosis, and differentiation (Dutta et al., 2006; Karin and Lin 2002). Recently, Li et al. showed that chronic HFD led to the depletion and neurogenic impairment of hypothalamic adult neural stem cells (htNSCs) associated with IKK β /NF κ B activation (Li et al., 2012).

Reportedly, maternal consumption of HFD during pregnancy produces an early inflammatory signal in the uterus and the blastocyst (Shankar et al., 2011). These authors suggested that inflammation and ectopic lipids may link maternal obesity to increased predisposition of offspring to obesity later in life. The ERS pathway is a key mediator for FFA-induced inflammation and insulin resistance in adipocytes with PERK and IKK β as the critical signaling components (Jiao et al., 2011). Other studies have also shown the association of inflammatory pathway activation and ERS (Calegari et al., 2011; Nurnberger et al., 2012; Ozcan et al., 2009). Moreover, hypothalamic inflammation seems to be important for the impairment of islets in pancreatic function and hepatic metabolism (Calegari et al., 2011; Milanski et al., 2012). Therefore, hypothalamic UPR activation in recently weaned mice may be important for the establishment of the obese phenotype and fatty liver in adult offspring. Our results show that

HFD-O at d28 has increased hypothalamic mRNA expression of proinflammatory cytokine (IL1- β). Although we did not observe significant differences in IL-10 and TNF α mRNA levels, other inflammatory factors and receptors were upregulated in the hypothalamic tissues of offspring from obese dams, as shown by Grayson et al. (Grayson et al., 2010). Furthermore, HFD-O mice have increased functioning of the proinflammatory p-JNK and NF κ B pathway. It is known that JNK and NF κ B activation are important mediators of inflammatory signals in the cell (Baud et al., 1999; Chu et al., 1999; Jiao et al., 2011) and can be activated by ERS signaling.

The intersection of the inflammatory signal with the ERS signaling pathway, leading to the impairment of cellular function, has been demonstrated in different models (Calegari et al., 2011; Hotamisligil 2010; Nurnberger et al., 2012; Ozcan et al., 2009; Ryan et al., 2012) and has been associated with obesity and insulin resistance (Ozcan et al., 2004). In a previous study employing the same model, our group showed that body weight was

increased in HFD-O mice soon after weaning. This phenotype was maintained until adulthood (Ashino et al., 2012), suggesting the initiation of important metabolic changes in the offspring from HFD dams. In addition, we evaluated the body weights on d0 and d7. Interestingly, on d0, the body weight of HFD-O mice was lower than that of SC-O mice; however, on d7, HFD-O mice had a more pronounced body weight, suggesting that the suckling period plays an important role in the observed body weight gain. Notably, the milk of DIO dams has a greater energy content (Neville et al., 1991), which may contribute to body weight gain in HFD-O during lactation.

Interestingly, the hypothalamus of recently weaned HFD-O mice showed higher expression of GRP94, GPR78, and XBP1s proteins and p-PERK and p-EIF2 α levels than that of SC-O mice. On

the other hand, in hypothalamic tissue from newborn HFD-O mice (d0), we did not observe an increase in UPR and inflammatory markers, thereby strengthening the role of lactation in metabolic damage. These proteins participate in the UPR pathway in the ER (Hotamisligil 2008; Hummasti and Hotamisligil 2010) and are activated in various tissues under conditions related to insulin resistance, obesity, and excess of nutrients (Cnop et al., 2012; Ozcan et al., 2004). As mentioned previously, the milk of DIO dams has lower levels of both total polyunsaturated fatty acids and monosaturated fatty acids and elevated lipid concentration than that of lean dams (Gorski et al., 2006). Thus, ERS in HFD-O mice may also be an effect of the high concentration of lipids in milk from HFD dams.

It is known that palmitate induces insulin resistance in a neuronal cell model associated with ERS through a JNK-dependent pathway (Mayer and Belsham 2010). Hypothalamic inflammation plays an important role in the installation and progression of obesity (De Souza et al., 2005; Hotamisligil 2010; Milanski et al., 2012; Shoelson et al., 2003). To investigate this possibility, we evaluated the hypothalamic p-AKT level in HFD-O mice after insulin challenge (IP). HFD-O mice showed lower hypothalamic AKT phosphorylation than SC-O mice, indicating the presence of early insulin resistance in the hypothalamus.

Insulin and leptin signaling in the hypothalamus plays an important role in energy homeostasis and controls food intake and peripheral metabolism (Andersson et al., 2004; Minokoshi et al., 2004; Namkoong et al., 2005; Stoppa et al., 2008). Hypothalamic AMPK participates as a cellular sensor of energy availability, switching off anabolic pathways and switching on catabolic pathways (Stark et al., 2013). Moreover, hypothalamic leptin and insulin signaling can promote AMPK dephosphorylation and thus modulate food intake and energy

expenditure (Andersson et al., 2004; Kim and Lee 2005; Minokoshi et al., 2004). HFD-O mice have higher hypothalamic phosphorylation of AMPK than SC-O mice. AMPK phosphorylates and inhibits ACC and reduces the hypothalamic synthesis of malonyl-coA that modulates food intake and energy expenditure. Interestingly, insulin injection diminishes hypothalamic AMPK phosphorylation in SC-O mice; however, this effect is not observed in HFD-O mice, reinforcing hypothalamic insulin resistance (data not shown). Although hypothalamic leptin signaling has not been evaluated in our study, it was recently reviewed (Breton 2013). Moreover, hypothalamic AMPK activation contributes to hyperphagia, and ICV administration of leptin and insulin reduce food intake as well as AMPK activity in diabetic rats (Namkoong et al., 2005). Interestingly, HFD-O mice (d28) show hyperphagia that can be a result of hypothalamic resistance to insulin signaling. Taken together, these data indicate that offspring from HFD dams exhibit damaged hypothalamic insulin signaling and cellular homeostasis. Furthermore, HFD-O mice have higher food intakes than SC-O mice, indicating that early insulin resistance can lead to the loss of the ability to modulate energy homeostasis and feeding behavior, resulting in excessive weight gain.

In a recent study, we observed that the liver from adult HFD-O mice displays triglycerides depots, JNK activation, and molecular insulin resistance (Ashino et al., 2012). It has been known that ERS can lead to altered lipid metabolism and hepatic steatosis (Basseri and Austin 2012). On the other hand, aberrant lipid metabolism causes hepatic ERS in obesity (Fu et al., 2011). Interestingly, the liver from recently weaned offspring (d28) from HFD dams was found to have increased proinflammatory (p-JNK, p-IKK, and NF κ B) and UPR (p-PERK and p-EIF2 α) proteins, hepatic TG, and retroperitoneal and epididymal fat mass. Although the inflammatory

pathway can be directly activated by free fatty acids (Boden et al., 2005), the effect of hypothalamic inflammation on the peripheral tissues cannot be dismissed. In this sense, previous studies have shown that inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function (Calegari et al., 2011) and hepatic insulin resistance (Muse et al., 2007) and that the inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver (Milanski et al., 2012). Moreover, the hepatic activation of UPR proteins *per se* can lead to altered lipid metabolism and hepatic steatosis (Basseri and Austin 2012).

These results suggest that hepatic cells as well as hypothalamic neurons were affected by maternal consumption of HFD. Therefore, considering the rapid development of insulin resistance in DIO models (Prada et al., 2005) and ERS and inflammation observed in both tissues from HFD-O, we believe that precocious hypothalamic dysfunction may be responsible for the onset of hepatic damage observed in the adult offspring.

In summary, our data show that recently weaned mice from HFD dams display ERS and proinflammatory protein activation in hypothalamic and hepatic tissues. However, the lactation period seems to be crucial for the early activation of the molecular pathway that leads to metabolic disturbance related to hypothalamic hormonal resistance and consequent impairment of glucose and energy homeostasis.

Acknowledgments

This work was supported by grants #2011/17656-0 and #2009/50809-5, São Paulo Research Foundation (FAPESP), and CNPq (#476643/2012-0).

References

- Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR, Carling D & Small CJ 2004 AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem* **279** 12005-12008.
- Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, Torsoni AS & Torsoni MA 2012 Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J Nutr Biochem* **23** 341-348.
- Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ & Velloso LA 2007 Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* **194** 539-550.
- Basseri S & Austin RC 2012 Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism: mechanisms and therapeutic potential. *Biochem Res Int* **2012** 841362.
- Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y & Karin M 1999 Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev* **13** 1297-1308.
- Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P, Xiang X, Luo Z & Ruderman N 2005 Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes* **54** 3458-3465.
- Breton C 2013 The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J Endocrinol* **216** R19-31.
- Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J & Shoelson SE 2005 Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med* **11** 183-190.
- Calegari VC, Torsoni AS, Vanzela EC, Araujo EP, Morari J, Zoppi CC, Sbragia L, Boschero AC & Velloso LA 2011 Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. *J Biol Chem* **286** 12870-12880.
- Carr TP, Andresen CJ & Rudel LL 1993 Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem* **26** 39-42.
- Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J & Karin M 1999 JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11** 721-731.
- Cnop M, Foufelle F & Velloso LA 2012 Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med* **18** 59-68.
- De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ & Velloso LA 2005 Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology* **146** 4192-4199.

Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G & Gelinas C 2006 Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB. *Oncogene* **25** 6800-6816.

Fu S, Yang L, Li P, Hofmann O, Dicker L, Hide W, Lin X, Watkins SM, Ivanov AR & Hotamisligil GS 2011 Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature* **473** 528-531.

Gorski JN, Dunn-Meynell AA, Hartman TG & Levin BE 2006 Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **291** R768-778.

Grayson BE, Levasseur PR, Williams SM, Smith MS, Marks DL & Grove KL 2010 Changes in melanocortin expression and inflammatory pathways in fetal offspring of nonhuman primates fed a high-fat diet. *Endocrinology* **151** 1622-1632.

Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S & Patel MS 2009 Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J Endocrinol* **200** 293-300.

Hotamisligil GS 2008 Inflammation and endoplasmic reticulum stress in obesity and diabetes. *Int J Obes (Lond)* **32 Suppl 7** S52-54.

Hotamisligil GS 2010 Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell* **140** 900-917.

Hummasti S & Hotamisligil GS 2010 Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res* **107** 579-591.

Jiao P, Ma J, Feng B, Zhang H, Diehl JA, Chin YE, Yan W & Xu H 2011 FFA-induced adipocyte inflammation and insulin resistance: involvement of ER stress and IKKbeta pathways. *Obesity (Silver Spring)* **19** 483-491.

Karin M & Lin A 2002 NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3** 221-227.

Kim MS & Lee KU 2005 Role of hypothalamic 5'-AMP-activated protein kinase in the regulation of food intake and energy homeostasis. *J Mol Med (Berl)* **83** 514-520.

Lalli CA, Pauli JR, Prada PO, Cintra DE, Ropelle ER, Velloso LA & Saad MJ 2008 Statin modulates insulin signaling and insulin resistance in liver and muscle of rats fed a high-fat diet. *Metabolism* **57** 57-65.

Li J, Tang Y & Cai D 2012 IKKbeta/NF-kappaB disrupts adult hypothalamic neural stem cells to mediate a neurodegenerative mechanism of dietary obesity and pre-diabetes. *Nat Cell Biol* **14** 999-1012.

Mayer CM & Belsham DD 2010 Palmitate attenuates insulin signaling and induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in hypothalamic neurons: rescue of resistance and apoptosis through adenosine 5' monophosphate-activated protein kinase activation. *Endocrinology* **151** 576-585.

McNay DE, Briancon N, Kokoeva MV, Maratos-Flier E & Flier JS 2012 Remodeling of the arcuate nucleus energy-balance circuit is inhibited in obese mice. *J Clin Invest* **122** 142-152.

Melo AM, Bittencourt P, Nakutis FS, Silva AP, Cursino J, Santos GA, Ashino NG, Velloso LA, Torsoni AS & Torsoni MA 2011 Solidago chilensis Meyen hydroalcoholic extract reduces JNK/IkappaB pathway activation and ameliorates insulin resistance in diet-induced obesity mice. *Exp Biol Med (Maywood)* **236** 1147-1155.

Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA, Romanatto T, Pascoal LB, Caricilli AM, Torsoni MA, et al. 2012 Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes* **61** 1455-1462.

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B, Mu J, Fofelle F, Ferre P, Birnbaum MJ, et al. 2004 AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature* **428** 569-574.

Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR, Romanatto T, Carvalheira JB, Oliveira AL, Saad MJ, et al. 2009 High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *PLoS One* **4** e5045.

Muse ED, Lam TK, Scherer PE & Rossetti L 2007 Hypothalamic resistin induces hepatic insulin resistance. *J Clin Invest* **117** 1670-1678.

Namkoong C, Kim MS, Jang PG, Han SM, Park HS, Koh EH, Lee WJ, Kim JY, Park IS, Park JY, et al. 2005 Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes* **54** 63-68.

Neville MC, Allen JC, Archer PC, Casey CE, Seacat J, Keller RP, Lutes V, Rasbach J & Neifert M 1991 Studies in human lactation: milk volume and nutrient composition during weaning and lactogenesis. *Am J Clin Nutr* **54** 81-92.

Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, Gross RW & Davidson NO 2003 Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem* **278** 51664-51672.

Nurnberger S, Miller I, Duvigneau JC, Kavanagh ET, Gupta S, Hartl RT, Hori O, Gesslbauer B, Samali A, Kungl A, et al. 2012 Impairment of endoplasmic reticulum in liver as an early consequence of the systemic inflammatory response in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **303** G1373-1383.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D, Myers MG, Jr. & Ozcan U 2009 Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab* **9** 35-51.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E, Tuncman G, Gorgun C, Glimcher LH & Hotamisligil GS 2004 Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science* **306** 457-461.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE, Corezola do Amaral ME, Hoer NF, Boschero AC & Saad MJ 2005 Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* **146** 1576-1587.

Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y & Cai D 2011 Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108** 2939-2944.

Ryan KK, Woods SC & Seeley RJ 2012 Central nervous system mechanisms linking the consumption of palatable high-fat diets to the defense of greater adiposity. *Cell Metab* **15** 137-149.

Saltiel AR 2012 Insulin resistance in the defense against obesity. *Cell Metab* **15** 798-804.

Santos GA, Pereira VD, Roman EA, Ignacio-Souza L, Vitorino DC, de Moura RF, Razolli DS, Torsoni AS, Velloso LA & Torsoni MA 2013 Hypothalamic inhibition of acetyl-CoA carboxylase stimulates hepatic counter-regulatory response independent of AMPK activation in rats. *PLoS One* **8** e62669.

Shankar K, Zhong Y, Kang P, Lau F, Blackburn ML, Chen JR, Borengasser SJ, Ronis MJ & Badger TM 2011 Maternal obesity promotes a proinflammatory signature in rat uterus and blastocyst. *Endocrinology* **152** 4158-4170.

Shoelson SE, Lee J & Yuan M 2003 Inflammation and the IKK beta/I kappa B/NF-kappa B axis in obesity- and diet-induced insulin resistance. *Int J Obes Relat Metab Disord* **27 Suppl 3** S49-52.

Stark R, Ashley SE & Andrews ZB 2013 AMPK and the neuroendocrine regulation of appetite and energy expenditure. *Mol Cell Endocrinol* **366** 215-223.

Stoppa GR, Cesquini M, Roman EA, Prada PO, Torsoni AS, Romanatto T, Saad MJ, Velloso LA & Torsoni MA 2008 Intracerebroventricular injection of citrate inhibits hypothalamic AMPK and modulates feeding behavior and peripheral insulin signaling. *J Endocrinol* **198** 157-168.

Won JC, Jang PG, Namkoong C, Koh EH, Kim SK, Park JY, Lee KU & Kim MS 2009 Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)* **17** 1861-1865.

Yuan M, Konstantopoulos N, Lee J, Hansen L, Li ZW, Karin M & Shoelson SE 2001 Reversal of obesity- and diet-induced insulin resistance with salicylates or targeted disruption of Ikkbeta. *Science* **293** 1673-1677.

Zhou H, Zhang K, Janciauskiene S & Li X 2012 Endoplasmic reticulum stress and lipid metabolism. *Biochem Res Int* **2012** 257528.

Table I: Nutritional composition of experimental and standard chow fed to mice during gestation and lactation

	Chow Diet¹	High-Fat Diet
Net protein (g %)	22,5	20,8
Ether Extract (Fat content) (g %)	4,5	23,6
Carbohydrates (g %)	55,0	41,2
Fibrous matter (g %)	8,0	5,8
Ash matter (g %)	10,0	8,6
Total	100,0	100,0
Kcal/g	3,5	4,6

¹(**NUVILAB**® Cr-1, Nuvital, *PR - Brasil*)

Figures

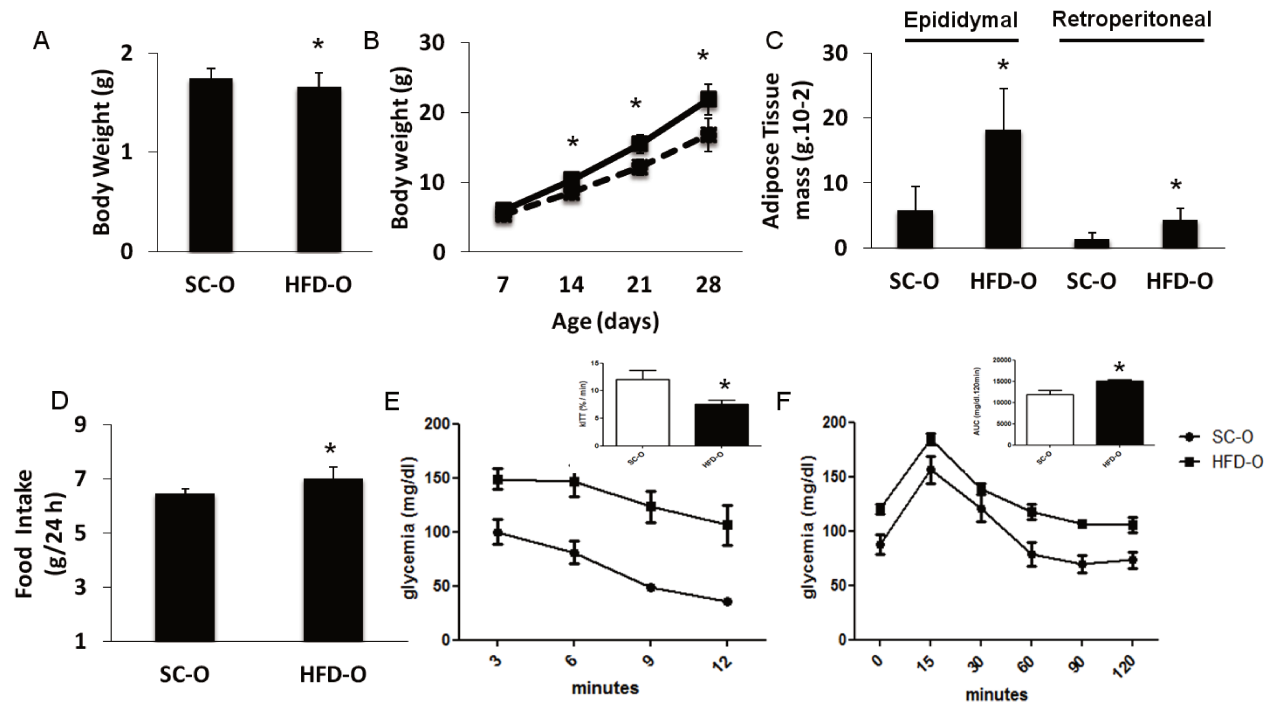


Fig. 1

Figure 1: Body weight at d0 (A) (n = 30 pups per group), body weight (B) (n = 15 pups per group), white adipose tissue depots at d28 (C) (n = 15 pups per group), cumulative food intake at d28 (D) (n = 5 pups per group), insulin tolerance test at d28 (insert: kITT) (E) (n = 5 pups per group), glucose tolerance test at d28 (insert: AUC) (F) (n = 5 pups per group). Data are means $\pm$ SEM. For B: dashed line (SC-O) and solid line (HFD-O). * $p \leq 0.05$ vs. SC-O.

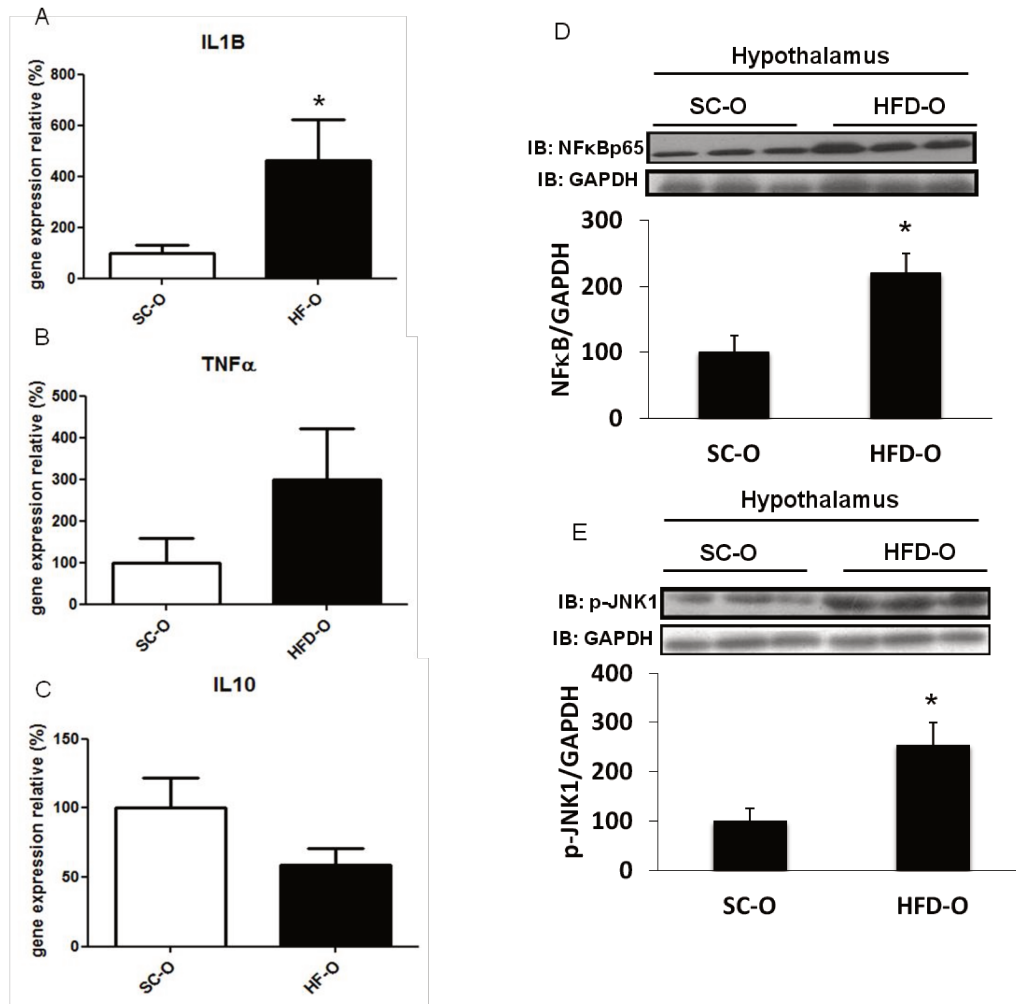


Fig. 2

Figure 2: Hypothalamic mRNA at d28 to IL1- β (n = 8 pups per group) (A), TNF α (n = 8 pups per group) (B), IL-10 (n = 8 pups per group) (C). Western blot analysis of hypothalamic total NF κ Bp65 (D) and p-JNK1 level (E). For control of gel loading, membranes were reblotted with GAPDH. Data are means $\pm$ SEM (n = 4 or 5). *p $\leq$ 0.05 vs. SC-O.

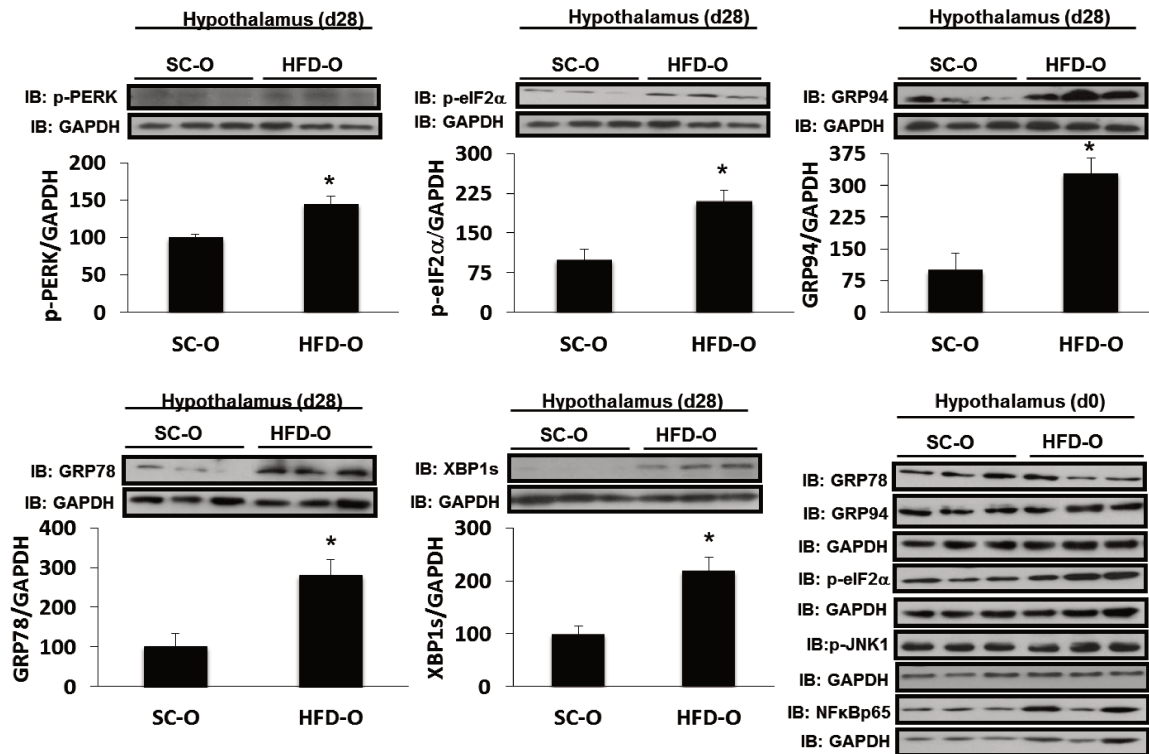


Figure 3: Western blot analysis of hypothalamic p-PERK (A) and p-eIF2α (B), total GRP94 (C), total GRP78 (D), and total XBP1s (E) levels in mice (d28). Western blot analysis of hypothalamic GRP78, GRP94, p-eIF2α, p-JNK, and NFκBp65 (F) levels in mice (d0). For control of gel loading, membranes were reblotted with GAPDH. Data are means $\pm$ SEM (n = 4 or 5). *p $\leq$ 0.05 vs. SC-O.

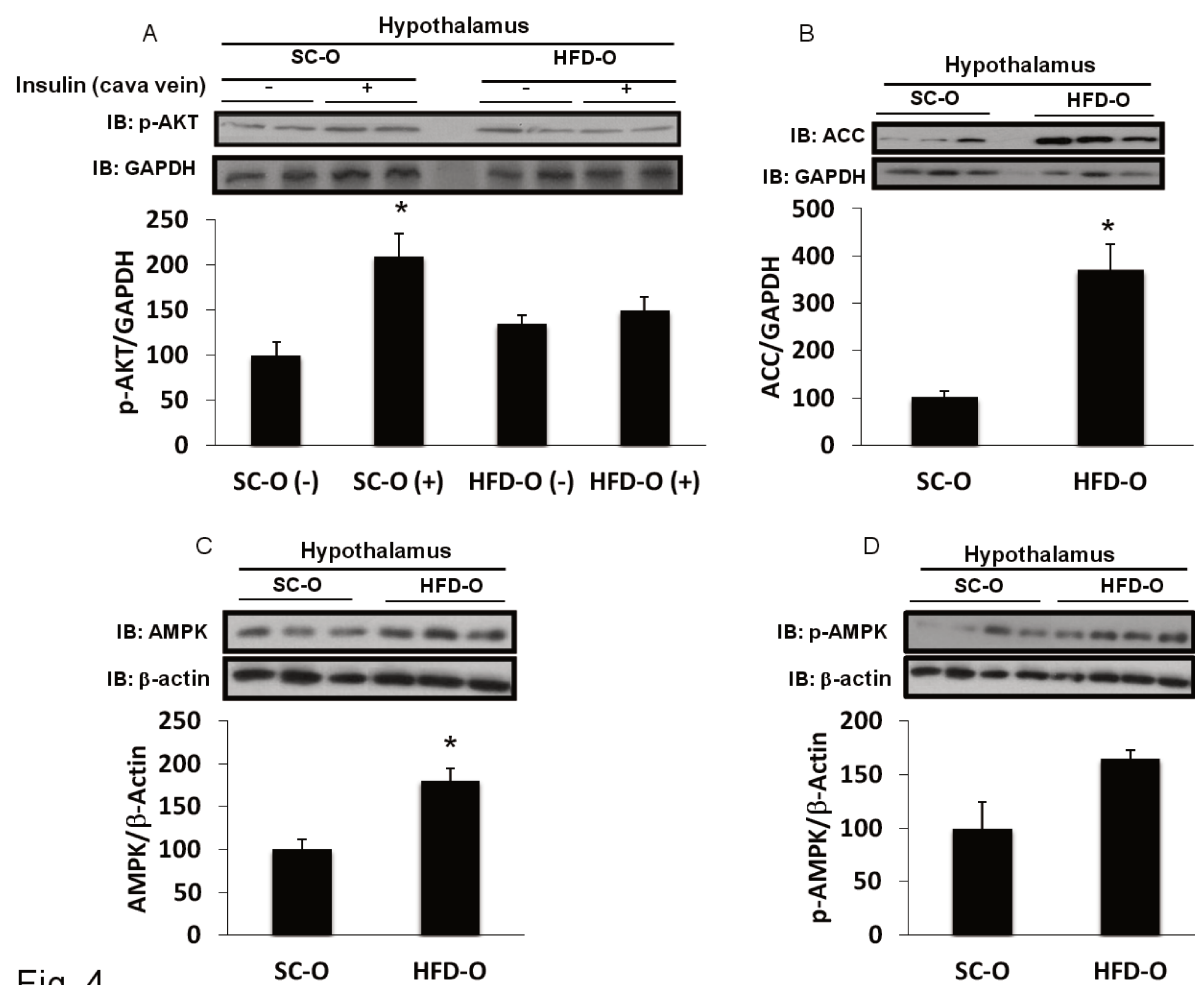


Fig. 4

Figure 4: Basal (–) hypothalamic AKT phosphorylation and after insulin injection (cava vein) (+) (A), hypothalamic total ACC (B), hypothalamic total AMPK (C), and hypothalamic phospho-AMPK (D). For control of gel loading, membranes were reblotted with GAPDH (for A and B) or β -actin (for C and D). Data are means $\pm$ SEM (n = 4 or 5). *p $\leq$ 0.05 vs. SC-O.

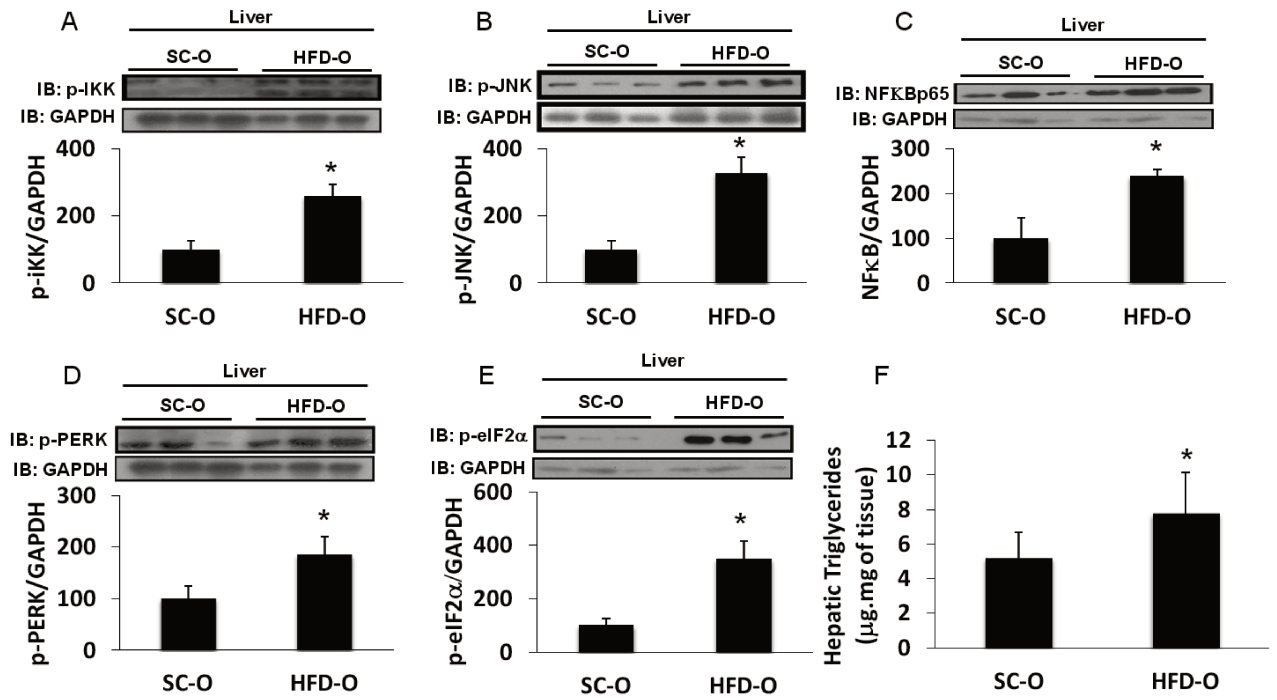


Fig. 5

Figure 5: Western blot analysis of hepatic p-IKK (A), p-JNK (B), NFκBp65 (C), p-PERK (D), p-eIF2α (E). For control of gel loading, membranes were reblotted with GAPDH. Hepatic triglycerides in SC-O and HFD-O mice (F). Data are means ± SEM (For A–E: n = 4 or 5; for F: n = 10). *p ≤ 0.05 vs. SC-O.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Está estabelecido que o consumo de dietas ricas em gordura, especialmente a saturada, induz a ativação de vias pró-inflamatórias em diferentes tecidos, como fígado, adiposo e hipotálamo, além do aumento sérico de citocinas, TNF α e IL1 β . (Hotamisligil et al. 1993, De Souza et al. 2005, Prada et al. 2005). No hipotálamo a inflamação está relacionada com uma perda na resposta anorexigênica dos hormônios leptina e insulina e contribui para o desequilíbrio entre o gasto e consumo energético (Schwartz et al. 2000; De Souza et al. 2005; Velloso et al. 2005). Estudos recentes demonstraram ser este o primeiro local a sofrer os efeitos de uma dieta hiperlipídica. Thaler et al. (2013) relatam que apenas 1 dia de consumo de HFD é suficiente para que marcadores inflamatórios possam ser detectados no hipotálamo, mesmo antes de se estabelecer o aumento no peso corpóreo. Além disso, Prada et al. (2005) descreveram que o consumo de dieta de cafeteria por ratos levou a resistência a insulina em diferentes tecidos, mas o primeiro a manifestar a ativação de serina quinases e o desenvolvimento de resistência foi o hipotálamo. Outros estudos também demonstram que a inflamação hipotalâmica pode levar ao comprometimento das funções das células β pancreáticas (Calegari et al. 2011) e metabolismo hepático (Milanski et al. 2012).

Durante o desenvolvimento intrauterino a presença de um ambiente rico em lipídeos contribui para o desenvolvimento precoce de inflamação no útero e blastocistos. Alguns autores sugerem que essa inflamação e o acúmulo ectópico de lipídeos presentes no útero materno pode ser um elo importante da obesidade materna com o aumento na predisposição da prole em desenvolver obesidade na vida adulta (Shankar et al. 2011). De acordo com Charlier et al. (2008) a obesidade materna também resulta em uma resposta inflamatória exacerbada na placenta, com aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF α e IL-6) e infiltração de macrófagos. Isto cria um ambiente que favorece a ativação de vias pró-inflamatórias que pode contribuir para as consequências metabólicas na prole.

A obesidade induzida por dieta (DIO) tem sido relacionada à indução de ERE e consequente ativação da via pró-inflamatória IKK β /NF κ B no hipotálamo (Zhang et al. 2008). Outros estudos também mostram a associação da ativação da via pró-inflamatória e o ERE

(Ozcan et al. 2004; Calegari et al. 2011). Assim, a ativação hipotalâmica de UPR em prole recém desmamada de camundongos com DIO durante a gestação e lactação pode ser um importante componente das alterações metabólicas observadas na prole adulta.

Em um estudo prévio do nosso grupo utilizando o mesmo modelo experimental, a prole de mães obesas (HFD-O) apresentou aumento no peso corpóreo pós-desmame e este fenótipo foi mantido até a fase adulta (Ashino et al. 2012), sugerindo que prole de mães obesas apresenta importantes alterações metabólicas. Nesse mesmo contexto o presente estudo avaliou o peso corpóreo a partir do primeiro dia de vida (d0) até o período pós-desmame, 28 dias de vida (d28). Nossos resultados apontam que o peso corpóreo no d0 foi menor no grupo HFD-O comparado ao SC-O, porém a partir do d7 o grupo HFD-O apresentou aumento no peso corpóreo até o dia experimental d28, indicando que o período de lactação tem um importante papel no ganho de peso observado.

O aumento no peso corpóreo em HFD-O foi acompanhado por um aumento na massa de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. Esse aumento de tecido adiposo tem sido descrito por diferentes autores em prole adulta de mães obesas, acompanhados da presença de alterações metabólicas importantes como hipertensão, hiperfagia, hiperinsulinemia (Khan et al. 2003, Khan et al. 2005, Samuelsson et al. 2008, Nivoit et al. 2009). O aumento de massa de tecido adiposo durante a amamentação pode refletir o maior ganho calórico durante neste período ou uma disfunção dos mecanismos centrais de controle da homeostase energética. É conhecido que o leite materno obtido de mães obesas apresenta composição lipídica rica em ácidos graxos saturados (Sun et al. 2012), e portanto, ele por si só poderia ser um componente nutricional importante no desencadeamento das alterações fenotípicas descritas para o grupo HFD. Embora, o consumo de leite durante a amamentação não tenha sido avaliado na prole, o consumo de ração após o desmame foi significativamente maior no grupo HFD-O, sugerindo que durante a amamentação o ganho energético dos camundongos HFD-O possa ter sido maior.

Dentre os fatores que contribuem para a progressão da adiposidade e progressão de distúrbios metabólicos, a resistência à insulina tem papel central. Nossos resultados apontam que prole de mães obesas (d28) apresenta menor sensibilidade à insulina observado pelo

teste de intolerância à insulina (ITTip), como também maior intolerância à glicose avaliada pelo teste de tolerância à glicose (GTTip) e aumento na AUC comparados a prole de mães controle.

Como descrito anteriormente, proteínas de vias pró-inflamatórias tais como, JNK e IKK, podem fosforilar em serina proteínas da via da insulina e dessensibilizar a célula a ação deste hormônio (Prada et al. 2005, Shoelson et al. 2006). O hipotálamo dos camundongos do grupo HFD-O exibiu maior ativação de vias pró-inflamatórias logo após o desmame (d28). O hipotálamo de HFD-O apresenta maiores níveis de RNAm da citocina pró-inflamatória (IL1- β). Porém, não observamos diferença significativa nos níveis de RNAm para citocina pró-inflamatória TNF α e IL10, uma citocina anti-inflamatória. Além disso, a expressão proteica de NF κ B e a fosforilação e ativação da serina quinase JNK também foram maiores no hipotálamo do grupo HFD-O. A ativação de JNK e NF κ B, são importantes mediadores da sinalização inflamatória na célula (Baud et al. 1999; Chu et al. 1999) e, como citado anteriormente, podem levar a resistência a insulina. Neste sentido, o grupo HFD-O apresentou menor fosforilação da proteína AKT após desafio com insulina, indicando a presença precoce de resistência hipotalâmica a insulina, provavelmente um reflexo da ativação de serina quinases.

As proteínas pró-inflamatórias podem ser ativadas através de diferentes vias, tais como através de receptores de citocinas, receptores do tipo *Toll Like* e por disfunção celular tal como observado no estresse de retículo endoplasmático (Milanski et al. 2009; Pierre et al. 2013). Diferentes modelos experimentais mostram a importante relação entre a obesidade induzida por dieta, com a ativação da sinalização inflamatória e a via do ERE, comprometendo nas funções celulares (Ozcan et al. 2009; Calegari et al. 2011; Nurnberger et al. 2012; Ryan et al. 2012).

Interessantemente, o hipotálamo do grupo HFD-O apresentou aumento na expressão de marcadores de ERE. Esses animais com 28 dias de vida apresentaram aumento na expressão proteica de GRP94 e GRP78 comparado ao SC-O. Ambas são proteínas chaperonas, que se encontram elevadas na presença de ERE para aumentar a capacidade de dobramento de proteínas e restaurar o sistema de qualidade do RE (Yoshida, 2006). Além disso, as proteínas XBP-1s, p-PERK e p-eIF2 α também estavam elevadas no hipotálamo do grupo HFD-O

em relação aos animais do grupo SC-O. Estas proteínas são importantes marcadores de estresse de retículo e participam da via UPR (Cnop et al. 2012; Ozcan et al. 2004). Desta maneira, nossos resultados mostram que o tecido hipotalâmico apresenta ativação precoce de vias de sinalização celular relacionadas a UPR. Neste estudo, o bloqueio farmacológico do ERE não foi realizado, mas a ativação precoce de proteínas pró-inflamatórias acompanhada de resistência à insulina indicam que o ERE pode ser a ligação entre o consumo de dieta rica em gordura durante a amamentação e os danos já descritos para a prole de mães obesas.

A importância do período de lactação é reforçada pelas análises realizadas com a prole no d0. Os resultados obtidos neste momento refletem o impacto do ambiente uterino, desde que em nenhum momento a prole teve contato com o leite materno. Interessante, os níveis hipotalâmicos de NF κ B, GRP78, GRP94, p-JNK e p-eIF2 α não foram diferentes entre os grupos HFD-O e SC-O. Sendo assim, esses resultados sugerem que a lactação desempenha uma importante função na ativação de vias inflamatórias e de ERE no hipotálamo da prole de mães obesas.

Muitos estudos descreveram o papel do consumo de uma dieta rica em gordura na ativação da via pró-inflamatória e o desenvolvimento de resistência à insulina e leptina (Shoelson et al. 2003; De Souza et al. 2005; Milanski et al. 2012), apontando o estresse de retículo endoplasmático como um dos mecanismos que precipitam o desenvolvimento desse quadro de resistência (Ozcan et al. 2004; Ozcan et al. 2009).

O hipotálamo é o principal centro do controle da homeostase energética por regular tanto o apetite, quanto o gasto energético (Flier, 2004; Wynne, 2005). Neste sentido, alterações moleculares que prejudicam a sinalização celular e a comunicação entre os diferentes sistemas podem contribuir de maneira decisiva para o ganho de peso e comorbidades associadas. Neurônios localizados no núcleo arqueado recebem sinais hormonais e nutricionais que são integrados e modulam o comportamento alimentar (Wynne, 2005).

A presença de resistência à insulina e/ou leptina nos neurônios hipotalâmicos, comprometem nos efeitos anorexigênicos, contribuindo para um balanço energético positivo e consequentemente o ganho de peso corpóreo (Schwartz et al. 2000; Velloso, 2005). Para

avaliar esta possibilidade, os níveis de p-AKT hipotalâmica, proteína chave da via de sinalização da insulina (Prada et al. 2005), foram mensurados em ambos grupos experimentais (SC-O e HFD-O) após estímulo com insulina. A fosforilação e ativação desta proteína está reduzida em HFD-O comparado a SC-O, indicando uma resistência hipotalâmica a esse hormônio em prole de mães obesas com 28 de vida. A propagação inadequada ou interrupção do sinal da insulina em seus vários níveis de ativação pode ainda ser dependente da ativação de serinas quinases, como JNK e IKK, que fosforilam em serina elementos importantes da via da insulina, como o IRS1 (Shoelson et al. 2006, Luca & Olefsky, 2009), impedindo sua ativação clássica através dos resíduos de tirosina. Em nosso modelo, a fosforilação de JNK está aumentada em prole de mães obesas, contribuindo para o quadro inflamatório e de resistência a insulina. Cabe ressaltar que a resistência hipotalâmica a insulina também pode contribuir para a maior ingestão de ração detectada na prole de mães obesas.

O comportamento alimentar também é regulado pela proteína AMPK que no hipotálamo age como um sensor celular na disponibilidade de energia, uma vez ativa, ativa vias catabólicas e inibe vias anabólicas (Lee et al. 2005; Lopaschuk et al. 2010). Como dito anteriormente, a sinalização hipotalâmica de leptina e insulina tem um importante papel na homeostase energética, de modo que podem promover a desfosforilação da AMPK e reduzir a ingestão alimentar (Andersson et al. 2004). O grupo HFD-O exibiu maior fosforilação hipotalâmica de AMPK comparados ao grupo SC-O. Uma vez ativa, a AMPK fosforila e inativa a proteína ACC, promovendo a redução na síntese de malonil-CoA no hipotálamo e maior ingestão (Lopaschuk et al. 2010). No entanto, a inibição hipotalâmica da AMPK contribui para hipofagia. A administração ICV de leptina ou insulina reduz a ingestão alimentar assim como a atividade da AMPK em ratos diabéticos (Namkoong et al. 2005). Interessantemente, como já citado anteriormente, a prole de mães obesas (d28) apresenta maior ingestão alimentar comparados a prole de mães controle. Esses resultados indicam que prole de mães obesas apresenta comprometimento na sinalização hipotalâmica à insulina e da homeostase celular, que podem levar ao aumento no peso corpóreo.

É conhecido que o tecido hepático possui papel central no metabolismo lipídico (Fu et al. 2012), porém a presença de ERE pode levar a alterações nesta via metabólica e levar

esteatose hepática através da modificação de enzimas envolvidas na lipogênese (Cnop et al. 2011, Fu et al. 2012). Como observado em um recente estudo, a prole de mães obesas adultas apresenta fígado gorduroso, ativação da serina quinase JNK e resistência à insulina hepática (Ashino et al. 2012). Interessantemente, a prole recém desmamada (d28) de mães obesas apresenta aumento de marcadores pró-inflamatórios, como p-JNK, p-IKK e NFκB no tecido hepático, assim como marcadores de UPR (p-PERK e p-eIF2α), triglicérides hepático e massa de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal. A ativação do ERE hepático é capaz de promover a clivagem proteolítica de ambos fatores de transcrição *sterol regulatory element-binding proteins 1c* (SREBP1c) e *sterol regulatory element-binding proteins 2* (SREBP2), que estimulam a síntese de ácidos graxos e colesterol, respectivamente, contribuindo para o desenvolvimento de esteatose hepática (Cnop et al. 2011, Fu et al. 2012).

Os ácidos graxos livres presentes na dieta por si só levam a ativação de vias inflamatórias (Boden et al. 2005) e estudos recentes tem mostrado que a inflamação hipotalâmica tem importantes consequências para o metabolismo nos tecidos periféricos. Estudos prévios mostram que a inflamação hipotalâmica leva a um defeito nas células betas pancreáticas, assim como a presença de marcadores de ERE (Calegari et al. 2011) e a inibição da inflamação no hipotálamo reverte a resistência à insulina hepática induzida por dieta (Milanski et al. 2012).

Nossos resultados sugerem que células hepáticas e neurônios hipotalâmicos de prole recém desmamada (d28) sofreram alterações decorrentes do consumo materno de dieta rica em gordura durante a gestação e lactação. Portanto, considerando o rápido desenvolvimento de resistência à insulina em modelos de DIO (Prada et al. 2005) e a ativação de proteínas proinflamatórias no hipotálamo com apenas 1 dia de HFD (Thaler et al. 2013), nós acreditamos que a disfunção hipotalâmica precoce pode ser responsável pelo início do dano hepático observado em prole adulta (Ashino et al. 2012).

Em conclusão, nossos dados mostram que prole recém desmamada de mães obesas apresenta ativação de proteínas pró-inflamatórias e marcadores de ERE no hipotálamo e fígado, assim como, aumento no peso corpóreo e presença de triglicérides hepático. No entanto, o período de lactação parece ser crucial para ativação de vias moleculares que

alteram o metabolismo, com consequente resistência à insulina hipotalâmica e perda da homeostase energética.

REFERÊNCIAS

Andersson U, Filipsson K, Abbott CR, Woods A, Smith K, Bloom SR et al. AMP-activated protein kinase plays a role in the control of food intake. *J Biol Chem*. 2004 Mar 26;279(13):12005-8.

Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman ER, Velloso LA et al. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J Nutr Biochem*. 2012 Apr;23(4):341-8.

Baud V, Liu ZG, Bennett B, Suzuki N, Xia Y, Karin M. Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAF2 and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain. *Genes Dev*. 1999 May 15;13(10):1297-308.

Boden G, She P, Mozzoli M, Cheung P, Gumireddy K, Reddy P et al. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor-kappaB pathway in rat liver. *Diabetes*. 2005 Dec;54(12):3458-65.

Boden G. Endoplasmic reticulum stress: Another link between obesity and insulin resistance/inflammation? *Diabetes*. 2009 Mar;58(3):518-9.

Breton C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. *J Endocrinol*. 2013 Jan 18;216(2):R19-31.

Cakir I, Cyr NE, Perello M, Litvinov BP, Romero A, Stuart RC et al. Obesity induces hypothalamic endoplasmic reticulum stress and impairs proopiomelanocortin (POMC) post-translational processing. *J Biol Chem*. 2013 Jun 14;288(24):17675-88.

Calegari VC, Torsoni AS, Vanzela EC, Araújo EP, Morari J, Zoppi CC et al. Inflammation of the hypothalamus leads to defective pancreatic islet function. *J Biol Chem*. 2011 Apr 15;286(15):12870-80.

Challier JC, Basu S, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, Mouzon H. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*. 2008 29: 274-181.

Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *The Journal of Neuroscience*. 2008 Nov: 28(46):12107–12119.

Chen H, Morris MJ. Differential responses of orexigenic neuropeptides to fasting in offspring of obese mothers. 2009 Jul; 17(7):1356-62.

Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, et al. JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity*. 1999 Dec;11(6):721-31.

Cnop M, Foufelle F, Velloso LA. Endoplasmic reticulum stress, obesity and diabetes. *Trends Mol Med*. 2012 Jan;18(1):59-68.

De Souza CT, Araújo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005 Oct; 146(10): 4192-4199.

Drake AJ, Reynolds RM. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. *Reproduction*. 2010 Sep;140(3):387-98.

Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):337-50.

Fu S, Watkins SM, Hotamisligil GS. The role of endoplasmic reticulum in hepatic lipid homeostasis and stress signaling. *Cell Metab*. 2012 May 2;15(5):623-34.

Gotoh T, Endo M, Oike Y. Endoplasmic reticulum stress-related inflammation and cardiovascular diseases. *Int J Inflam*. 2011;2011:259462.

Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic reticulum stress is reduced in tissues of obese subjects after weight loss. *Diabetes*. 2009 Mar; 58(3): 693-700.

Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. *Endocrinology*. 2003 Dec;144(12):5179-83.

Hayden MS, Ghosh S. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 2004 Sep 15;18(18):2195-224.

Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH. The unfolded protein response: Integrating stress signals through the stress sensor IRE1 α . *Physiol Rev*. 2011 Oct. 91: 1219–1243.

Hetz C. The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Jan 18;13(2):89-102.

Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science*. 1993 Jan 1;259(5091):87-91.

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. *Cell*. 2010a March; 140, 900–917.

Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med.* 2010b Apr;16(4):396-9.

Howe GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol.* 2009 587.4, 905-915.

Hummasti S, Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and inflammation in obesity and diabetes. *Circ Res.* 2010 Sep 3;107(5):579-91.

Ikegami M, Ikeda H, Ohashi T, Ohsawa M, Ishikawa Y, Kai M et al. Olanzapine increases hepatic glucose production through the activation of hypothalamic adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Diabetes Obes Metab.* 2013 Jun 19.

Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CYI et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002 Jun; 3(6): 411-21.

Khan IY, Taylor PD, Dekou V, Seed PT, Lakasing L, Graham D et al. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension.* 2003 Jan; 41(1): 168-75.

Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005 Jan; 288(1): R127-33.

Kahn BB, Alquier T, Carling D, Hardie DG. AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism. *Cell Metab.* 2005 Jan;1(1):15-25.

Kinote A, Faria JA, Roman EA, Solon C, Razolli DS, Ignacio-Souza LM et al. Fructose-induced hypothalamic AMPK activation stimulates hepatic PEPCK and gluconeogenesis due to increased corticosterone levels. *Endocrinology.* 2012 Aug;153(8):3633-45.

Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 April; 404, 635-643.

Lage R, Diéguez C, Vidal-Puig A, López M. AMPK: a metabolic gauge regulating whole-body energy homeostasis. *Trends Mol Med*. 2008 Dec;14(12):539-49.

Lee WJ, Koh EH, Won JC, Kim MS, Park JY, Lee KU. Obesity: the role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in body weight regulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Nov;37(11):2254-9.

Levin BE. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2006 Jul 29;361(1471):1107-21.

Li J, Huang J, Li JS, Chen H, Huang K, Zheng L. Accumulation of endoplasmic reticulum stress and lipogenesis in the liver through generational effects of high fat diets. *J Hepatol*. 2012 Apr;56(4):900-7.

Lopaschuk GD, Ussher JR, Jaswal JS. Targeting intermediary metabolism in the hypothalamus as a mechanism to regulate appetite. *Pharmacol Rev*. 2010 Jun;62(2):237-64.

Luca C, Olefsky JM. Inflammation and insulin resistance. *FEBS Lett*. 2008 Jan 9;582(1):97-105.

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 Feb; 119(2): 323-35.

Minokoshi Y, Alquier T, Furukawa N, Kim YB, Lee A, Xue B et al. AMP-kinase regulates food intake by responding to hormonal and nutrient signals in the hypothalamus. *Nature*. 2004 Apr 1;428(6982):569-74.

Milanski M, Degasperi G, Coope A, Morari J, Denis R, Cintra DE, et al. Saturated fatty acids produce an inflammatory response predominantly through the activation of TLR4 signaling in hypothalamus: implications for the pathogenesis of obesity. *J Neurosci*. 2009 Jan; 29(2): 359-70.

Milanski M, Arruda AP, Coope A, Ignacio-Souza LM, Nunez CE, Roman EA et al. Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. *Diabetes*. 2012 Jun;61(6):1455-62.

Moraes JC, Coope A, Morari J, Cintra DE, Roman EA, Pauli JR et al. High-fat diet induces apoptosis of hypothalamic neurons. *Plos One*. 2009 Apr; 4(4):e5045.

Namkoong C, Kim MS, Jang PG, Han SM, Park HS, Koh EH et al. Enhanced hypothalamic AMP-activated protein kinase activity contributes to hyperphagia in diabetic rats. *Diabetes*. 2005 Jan;54(1):63-8.

Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*. 2009 Jun; 52(6): 1133-42.

Nürnberg S, Miller I, Duvigneau JC, Kavanagh ET, Gupta S, Hartl RT et al. Impairment of endoplasmic reticulum in liver as an early consequence of the systemic inflammatory response in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Dec 15;303(12):G1373-83.

Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2009 Oct;1(4):a000034.

Onis M, Blossner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children¹⁻⁴. *Am J Clin Nutr*. 2010; 92: 1257-1264.

Otoda T, Takamura T, Misu H, Ota T, Murata S, Hayashi H et al. Proteasome Dysfunction Mediates Obesity- induced endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in the liver. *Diabetes*. 2013 Mar.62(3): 811-824.

Ozcan U, Cao Q, Yilmaz E, Lee AH, Iwakoshi NN, Ozdelen E et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science*. 2004 Oct; 306, 457-461.

Ozcan U, Yilmaz E, Ozcan L, Furuhashi M, Vaillancourt E, Smith RO et al. Chemical chaperones reduce ER stress and restore glucose homeostasis in a mouse model of type 2 diabetes. *Science*. 2006 Aug; 313, 1137-1140.

Ozcan L, Ergin AS, Lu A, Chung J, Sarkar S, Nie D et al. Endoplasmic reticulum stress plays a central role in development of leptin resistance. *Cell Metab*. 2009 Jan 7;9(1):35-51.

Pierre N, Deldicque L, Barbé C, Naslain D, Cani PD, Francaux M. Toll-like receptor 4 knockout mice are protected against endoplasmic reticulum stress induced by a high-fat diet. *PLoS One*. 2013 May 31;8(5):e65061.

Plagemann A, Harder T, Kohlhoff R, Rohde W, Dörner G. Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 1997 Jun; 21(6): 451-6.

Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Ueno M, Hirata AE et al. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*. 2005 Mar;146(3):1576-87.

Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. 1976 Aug 12;295(7):349-53.

Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr*. 1999 Nov;70(5):811-6.

Rother E, Kuschewski R, Alcazar MA, Oberthuer A, Bae-Gartz I, Vohlen C et al. Hypothalamic JNK1 and IKK β activation and impaired early postnatal glucose metabolism after maternal perinatal high-fat feeding. *Endocrinology*. 2012 Feb;153(2):770-81.

Ryan KK, Woods SC, Seeley RJ. Central nervous system mechanisms linking the consumption of palatable high-fat diets to the defense of greater adiposity. *Cell Metab*. 2012 Feb 8;15(2):137-49.

Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH 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 Feb; 51(2): 383-92.

Santos GA, Pereira VD, Roman EA, Ignacio-Souza L, Vitorino DC, de Moura RF et al. Hypothalamic inhibition of acetyl-CoA carboxylase stimulates hepatic counter-regulatory response independent of AMPK activation in rats. *PLoS One*. 2013 Apr 23;8(4):e62669.

Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr, Seeley RJ, Baskin DG. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 2000 Apr 6;404(6778):661-71.

Shankar K, Zhong Y, Kang P, Lau F, Blackburn ML, Chen JR et al. Maternal obesity promotes a proinflammatory signature in rat uterus and blastocyst. *Endocrinology*. 2011 Nov;152(11):4158-70.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB. Inflammation and insulin resistance. *J Clin Invest*. 2006 Jul; 116(7):1793-801.

Spiegelman BM, Flier JS. Obesity and the regulation of energy balance. *Cell*. 2001 Feb; 104, 531-543.

Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of Obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004 Jun; 89(6):2522–2525.

Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes*. 2012 Nov;61(11):2833-41.

Tam AB, Mercado EL, Hoffmann A, Niwa M. ER stress activates NF- κ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK. *PLoS One*. 2012;7(10):e45078.

Thaler JP, Yi CX, Schur EA, Guyenet SJ, Hwang BH, Dietrich MO et al. Obesity is associated with hypothalamic injury in rodents and humans. *J Clin Invest*. 2012 Jan 3;122(1):153-62.

Velloso LA. O Controle Hipotalâmico da Fome e da Termogênese – Implicações no Desenvolvimento da Obesidade. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2006 Apr;50(2):165-76.

Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Jul;279(1):E83-7.

Warner MJ, Ozanne SE. Mechanisms involved in the developmental programming of adulthood disease. *Biochem J*. 2010; 427, 333-347.

Willians KW, Elmquist JK. From neuroanatomy to behavior: central integration of peripheral signals regulating feeding behavior. *Nature Neuroscience*. 2012 Oct; 15(10), 1350-1355.

Wynne K, Stanley S, McGowan B, Bloom S. Appetite control. *Journal of Endocrinology*. 2005; 184, 291-318.

Yoshida H. ER stress and diseases. *FEBS Journal*. 2007 Dec; 274, 630-658.

WHO. World Health Organization: Obesity and overweight Fact sheet. 2013 March; 311.

Won JC, Jang PG, Namkoong C, Koh EU, Kim SK, Park JY et al. Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity*. 2009 Oct; 17(10): 1861-5.

Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKKbeta/NF-kappaB and ER stress link overnutrition to energy imbalance and obesity. *Cell*. 2008 Oct 3;135(1):61-73.

ANEXOS



CEUA/Unicamp

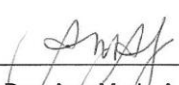
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

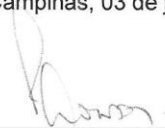
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto **"Ativação da "Resposta a Proteínas mal Formadas-UPR" na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação"** (protocolo nº **2758-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni / Arine de Mattos Melo**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **03 de julho de 2012**.

Campinas, 03 de julho de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>

Submissão do Artigo Científico

Ms. Ref. No.: METABOLISM-D-13-00714

Title: Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation

Metabolism

Dear Dr. Marcio Alberto Torsoni,

Your submission "Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation" has been assigned manuscript number METABOLISM-D-13-00714.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/metabolism/>
2. Enter your login details
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to Metabolism.

Sincerely yours,

Amanda Parbus
Journal Manager
Metabolism