



RAFAELA BENATTI DE OLIVEIRA

Avaliação da expressão hepática de microRNAs relacionados ao metabolismo lipídico na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta

LIMEIRA

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS APLICADAS

Rafaela Benatti de Oliveira

**Avaliação da expressão hepática de microRNAs relacionados ao
metabolismo lipídico na prole de camundongos com obesidade induzida
por dieta**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni

Esse exemplar corresponde à versão final da
dissertação defendida pela aluna Rafaela Benatti de
Oliveira e orientada pela Prof(a). Dr(a). Adriana
Souza Torsoni.

A handwritten signature in blue ink that reads "Adriana Torsoni".

LIMEIRA

2013

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

Oliveira, Rafaela Benatti, 1989-
OI4a Avaliação da expressão hepática de microRNAs relacionados ao metabolismo lipídico na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta / Rafaela Benatti de Oliveira. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Adriana Souza Torsoni.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Aplicadas.

1. Lipídios - metabolismo. 2. Obesidade. 3. Dieta hiperlipídica. 4. MicroRNAs. I. Torsoni, Adriana Souza. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of hepatic expression of microRNAs related to lipid metabolism in the offspring of mice with diet-induced obesity **Palavras-chave em inglês:**

Lipid - Metabolism

Obesity

High-fat diet

MicroRNA

Área de concentração: Metabolismo e Biologia Molecular

Titulação: Mestra em Ciências da Nutrição e do Esporte e Metabolismo **Banca examinadora:**

Adriana Souza Torsoni [Orientador]

Rodrigo Ferreira de Moura

Vanessa Cristina Arantes

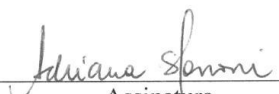
Data de defesa: 04-10-2013

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

Limeira, 04 de outubro de 2013

BANCA EXAMINADORA


Prof(a). Dr(a) Adriana Souza Torsoni


Assinatura

Prof. Dr. Rodrigo Ferreira de Moura


Assinatura

Prof(a). Dr(a). Vanessa Cristina Arantes


Assinatura

ABSTRACT

Maternal consumption of high-fat diet (HFD) during pregnancy and lactation is closely related to liver lipid accumulation, insulin resistance development, and increased serum cytokines in offspring and into adulthood. MicroRNAs (miRNAs) have been implicated in cholesterol biosynthesis and fatty acid metabolism. In the present study we evaluated the modulation of hepatic fatty acid synthesis (de novo), as well as modulation of fatty acid oxidation and miR-122 and miR-370 expression in recently weaned offspring (d28) of mice dams fed high fat diet (group HFD-O) or standard chow (group SC-O) during pregnancy and lactation. Compared with SC-O mice, HFD-O mice weighed more, had a larger adipose tissue mass and were more intolerant to glucose and insulin. HFD-O mice also presented more serum cholesterol, triglycerides, non-esterified fatty acids and hepatic IKK and JNK phosphorylation compared with SC-O mice. Protein levels of FAS, ACC and HMGCR were similar in HFD-O and SC-O mice, whereas SCD1 mRNA and protein were more abundant in HFD-O mice compared with SC-O mice. Interestingly, mRNA expression of β -oxidation-related genes ACADVL and CPT1 was decreased in HFD-O mice. Although we did not observe a difference in hepatic HNF4 α levels, the expression of miR-122 was reduced but that of miR-370 was increased in HFD-O mice compared with that in SC-O mice. Changes in hepatic lipid metabolism were accompanied by increased triglyceride deposition in HFD-O mice. Taken together, our results strongly suggest that maternal consumption of HFD affects the early lipid metabolism of offspring by modulating the expression of hepatic β -oxidation-related genes and miRNAs that can contribute to metabolic disturbances in adult life.

Keys words: lipid metabolism, maternal imprint, obese mice, high-fat diet, microRNA.

RESUMO

O consumo materno de uma dieta rica em gordura (HFD), durante a gestação e lactação, está intimamente relacionado com o acúmulo de lipídios no fígado, o desenvolvimento de resistência à insulina e o aumento de citocinas no soro na vida adulta da prole. MicroRNAs (miRNAs) têm sido relacionados com a biossíntese do colesterol e com o metabolismo dos ácidos graxos. No presente estudo nós avaliamos a modulação da síntese hepática de ácidos graxos (de novo), bem como a modulação da oxidação de ácidos graxos e a expressão dos microRNAs miR-122 e miR-370 na prole de camundongos recém desmamados (d28), cuja mãe foi alimentada com dieta hiperlipídica (grupo HFD-O) ou com ração padrão (grupo SC-O) durante a gestação e lactação. Comparado com os camundongos SC-O, os camundongos HFD-O apresentaram um maior peso corpóreo, maior massa de tecido adiposo e intolerância à glicose e à insulina. Camundongos do grupo HFD-O também apresentaram níveis séricos elevados de colesterol, triglicérides, ácidos graxos não esterificados e maior fosforilação hepática de IKK e JNK em comparação com camundongos SC-O. Os níveis proteicos de FAS, ACC e HMGCR foram semelhantes entre os camundongos HFD-O e SC-O, enquanto os níveis de proteína e de RNAm de SCD1 foram mais abundantes nos camundongos HFD-O comparados com camundongos SC-O. Curiosamente, a expressão de RNAm de genes relacionados com a β -oxidação, como ACADVL e CPT1 estava diminuída em camundongos HFD-O. Embora não tenha sido observada uma diferença nos níveis hepáticos de HNF4 α , a expressão de miR-122 estava diminuída, e a expressão de miR-370 estava aumentada em HFD-O em comparação com camundongos SC-O. Alterações no metabolismo lipídico hepático foram acompanhados pelo aumento na deposição de triglicérides em camundongos HFD-O. Em conjunto, nossos resultados sugerem fortemente que o consumo materno de HFD afeta precocemente o metabolismo lipídico da prole de camundongos através da modulação da expressão de genes e miRNAs relacionados com a β -oxidação hepática e que podem contribuir para as alterações metabólicas na vida adulta.

Palavras Chave: Metabolismo de lipídeos, programação materna, obesidade, dieta hiperlipídica, microRNA.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

INTRODUÇÃO.....	18
OBJETIVOS.....	32
Objetivo Geral.....	32
Objetivos Específicos.....	32
CAPÍTULO 1- <i>Artigo</i>	33
Abstract	34
Introduction	34
Methods	36
Results	40
Discussion	45
Acknowledgements	49
References	49
DISCUSSÃO.....	56
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	66
APÊNDICE.....	84
CEUA/UNICAMP	84
Artigos Submetidos	85
Participações em Congressos	85

Dedico esse trabalho a todos que me fazem querer ser alguém melhor a cada dia,

A Deus,

Que mostrou o quanto a minha vida é valiosa e me permitiu estar aqui.

À minha mãe,

Por me educar, me mostrar os verdadeiros valores da vida, por saber a hora de dizer não e o momento exato do sim, tudo isso fez com que eu me tornasse uma pessoa de bem e querer sempre me assemelhar a você, obrigada por jamais desistir de mim.

À minha família,

Ao meu irmão, minha cunhada, meu pai, meus tios e tias, primos e primas e amigos, por jamais desistir de estar comigo, por acreditarem em mim, me apoiar e torcer pelo meu sucesso. Sem vocês tudo seria mais difícil e menos divertido.

Ao LabDime e ao Labsincel,

Por permitir o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos animais,

Por doarem as vidas para que este trabalho pudesse acontecer.

*Há três coisas fundamentais para a felicidade:
alguma coisa para fazer,
alguém para amar e
algo para esperar.*

Joseph Addison

AGRADECIMENTOS

**"Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, pois cada pessoa é única
e nenhuma substitui outra.
Cada um que passa em nossa vida,
passa sozinho, mas não vai só
nem nos deixa sós.
Leva um pouco de nós mesmos,
deixa um pouco de si mesmo.
Há os que levam muito,
mas há os que não levam nada.
Essa é a maior responsabilidade de nossa vida,
e a prova de que duas almas
não se encontram ao acaso ".**

(Antoine de Saint-Exupéry)

Por esta razão..., meus agradecimentos:

A *Deus* "... por colocar pessoas maravilhosas em meu caminho e permitir que desse encontro gerassem bons frutos para a vida toda...".

A minha mãe, *Rosângela*, por me amar, me educar, me compreender e por ser aquela pessoa maravilhosa que fez de mim o que eu sou hoje. Aos meus irmãos *Leonardo e Aline* por tudo que passamos juntos, por nunca nos separarmos, por sempre me ajudarem e pelo nosso amor.

A minha Grande família: minhas avós *Dirce e Leonor* por ajudarem na minha criação e formação, a chata e brava ama muito vocês duas. Ao meu pai, *João*, pela minha vida e por me amar mesmo distante. Aos meus tios e primos por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, agradeço em especial a *Daniela Paiato* e a minha filha postiça *Isabella Paiato* por torcerem pelo meu sucesso. Aos meus queridos e amados animais que eu considero como filhos *Simba, Naomi, Nenê e Nica*.

A minha orientadora *Adriana Torsoni*, expresseo meu profundo agradecimento pela orientação que mais uma vez foi excepcional, pela oportunidade de integrar esse grupo de pesquisa, pela confiança, por todo apoio, e ter auxiliado no meu amadurecimento pessoal e científico, muito obrigada pela paciência e delicadeza em todos os momentos. Aproveito para dizer o quanto foi bom trabalhar com você, que tenho muito orgulho de ser sua aluna e você é um exemplo a ser seguido, muito obrigada.

Aos professores *Marciane Milanski* e *Márcio Torsoni*, por serem excelentes profissionais, pela amabilidade, amizade e boa disposição em todos os momentos. O convívio com vocês foi essencial para o meu crescimento pessoal e profissional, muito obrigada!!!

Ao professor *Lício Velloso*, pela valiosa oportunidade de colaboração, integrar seu grupo de pesquisa e trabalhar em seu laboratório, esse convívio e aprendizado foi fundamental para realização desse trabalho, muito obrigada.

A grande amiga que fiz nessa trajetória *Arine Melo*, por ser meu braço direito do começo ao fim, aquela que confio plenamente, por ser o “robin do meu batman”, o “piu-piu do meu frajola”, “o magro do meu gordo”, o “trio parada dura”, “irmãs gêmeas”, (...risos), eu não poderia te agradecer seriamente, pois senão não seria nós, concorda? Acho que sim!!! Mas falando sério agora eu agradeço imensamente por ter convivido com você, por sua ajuda, disposição, risadas, fofocas e fofoquinhas, confissões, conselhos, paciência, apoio, dedicação, por sua amizade!!! Eu espero estar presente ao seu lado em cada etapa e em cada vitória da sua vida. **“Não importa a distância no coração estaremos sempre perto”**.

Agradeço especialmente a *Arine Melo*, *Fernanda Borges* e *Letícia Souza*, aquelas que se dedicaram a esse trabalho como se fosse o trabalho delas, pessoas as quais eu escolheria novamente para trabalhar comigo, vocês foram essenciais. Agradeço ainda a *Letícia Souza*, por sua amizade, empenho, dedicação, por ter o prazer de ensinar, por andar lado a lado comigo e por contribuir para o meu crescimento pessoal e no desenvolvimento desse trabalho.

A todos os amigos, colegas e companheiros do Laboratório de Distúrbios do Metabolismo (LabDime), *Ana Carolina Ferraz, Andressa Reginato, Angélica Sartori, Arine Melo, Caroline Okino, Daisuke Hayashi, Dani Vitorino, Débora Vitoréli, Fernanda Borges, Gustavo dos Santos, Josiane Miyamoto, Laís Simino, Mariana Portovedo, Marina Fontana, Milena Versutti, Natália F. Costa, Simone Lemes, Tanyara baliani e Thais de Fante*. Apesar de ter convivido pouco com alguns de vocês eu tenho certeza que crescemos juntos e aprendemos muito com tudo que passamos, obrigada por toda a ajuda.

A todos os amigos, colegas e companheiros do Laboratório de Sinalização Celular (Labsincel) pelo convívio e aprendizado, agradeço em especial aos técnicos *Érica Anne, Gerson Ferraz, Joseane Morari e Márcio Cruz*, pela competência, ajuda e apoio que vocês oferecem aos alunos, sem vocês tudo seria mais difícil. Agradeço ainda aqueles que me ajudaram desde o começo, a quem eu tenho um grande apreço e que pude conhecer e conviver, *Albina Ramalho, Andressa Coope, Bruna Bombassaro, Carina Solon, Dani Razolli, Gabi de Souza, Letícia Souza, Livia Bitencourt, Lucas Ribeiro, Juliana Faria, Mariana Portovedo, Nathália Dragano, Rodrigo Moura e Thiago Matos*.

As “meninas” que dividi um lar em Limeira-SP, *Andressa Reginato, Laís Simino e Mariana Portovedo*, obrigada pelo convívio que tivemos por formarmos uma mini família, por tornarem esse período longe de casa o mais agradável e harmonioso possível, pela companhia, pelas jantas e almoços juntas, obrigada.

Aos meus grandes e eternos amigos que fazem parte da minha família, são verdadeiros irmãos que a vida me apresentou, *Bruna Vintecino, Lesley Burato, Luiz Burato, Thaty Giaretta, Fernando Graciano, Thais Moraes, Milene Carvalho, Isabela Marinelli, Karina Ferraz, Nathália Dragano*, obrigada pela amizade sempre, vocês são essenciais, sem vocês não dá... **“Eu poderia suportar, embora não sem dor, que tivessem morrido todos os meus amores, mas enlouqueceria se morressem todos os meus amigos” (Fernando Pessoa)**.

À *Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* pelo auxílio financeiro e a *FAPESP* pela concessão da bolsa de estudos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcutá)

LISTA DE ABREVIATURAS

ACADVL	Acil Coenzima A Desidrogenase
ACC	Acetil CoA Carboxilase
AMPK	Proteina Quinase Ativada por AMP
AUC	Área Sob a Curva
CPT1	Carnitina Palmitoil Transferase 1
DGAT	Diacilglicerol Aciltransferase
DHGNA	Doença Hepática Gordurosa Não Alcoólica
DM2	Diabetes <i>Mellitus</i> tipo 2
EHNA	Esteatohepatite Não Alcoólica
ESNA	Esteatose Hepática Não Alcoólica
FAS	Ácido Graxo Sintase
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GPAT ou GPAM	Glicerol-3-fosfato aciltransferase
GTTip	Teste de Tolerância a Glicose Intraperitoneal
HCC ou CHC	Carcinoma Hepatocelular
HCV	Vírus da Hepatite C
HFD-O	Prole de mães alimentadas com dieta Hiperlipídica
HMGCR	3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A redutase
HNF	Fatores Nucleares Hepáticos
HSL	Lipase Hormônio Sensível
IKK	Quinase do Inibidor ‘capa’ B

IL-6	Interleucina 6
IMC	Índice de Massa Corpórea
IRS-1	Substrato do Receptor de Insulina 1
JNK	Jun N-terminal Quinase
kITT	Teste de Tolerância à Insulina
MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos
miRNAs	microRNAs
NEFA	Ácidos Graxos livre não esterificados
PAI-1	Inibidor do Plasminogênio-1
PKC	Proteína Quinase C
qRT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real
RCQ	Relação Cintura Quadril
RBP-4	Proteína Ligante do Retinol-4
RI	Resistência à Insulina
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA _m	RNA mensageiro
SAA	Amiloide Sérico A
SCD1	Estearoil-Coenzima A Dessaturase 1
SC-O	Prole de mães alimentadas com dieta Controle
EPM	Erro Padrão da Média
SREBP	Proteína de ligação ao elemento de resposta aos esteróides
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
VLDL	Lipoproteína de densidade muito baixa

WB	Western Blotting ou Imuno Blotting
WHO	Organização Mundial de Saúde

INTRODUÇÃO

Há algum tempo a obesidade vem sendo considerada uma epidemia global. Essa alteração é definida pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013) como um acúmulo de massa gordurosa no tecido adiposo.

A obesidade é uma doença de causas multifatoriais, determinada por uma forte relação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais, que contribuem para o aumento do peso corporal. Assim, o comportamento adquirido pela sociedade industrializada, como sedentarismo, hábitos alimentares inadequados decorrentes de uma transição nutricional, ou a combinação de ambos, têm levado ao aumento da prevalência da obesidade (Raman, 2002; Stein, 2004; Pausova, 2006).

A transição nutricional, segundo Popkin e colaboradores (1993), corresponde às mudanças dos padrões nutricionais, modificando a dieta das pessoas e se correlacionando com mudanças sociais, econômicas, demográficas e relacionadas à saúde. Essa transição trás mudanças no perfil da saúde da população, sendo o aumento do sobrepeso e obesidade os principais legados. No Brasil o marco da transição nutricional foi a mudança da relação demográfica, onde a população da zona rural se mudou para a zona urbana, e a inserção da mulher no mercado de trabalho, principalmente na década de 70 (Gigante et al., 1997; Marinho et al., 2003; Pinheiro et al., 2004; Coutinho., 2008).

À partir desse momento observou-se então uma redução considerável no consumo de carboidratos complexos, frutas, verduras e legumes e um aumento no consumo de ácidos graxos saturados, açúcares, refrigerantes, álcool, produtos industrializados com excesso de ácidos graxos “trans”, carnes, leite e derivados ricos em gorduras, guloseimas como doces, chocolates, balas, etc. Tal modificação gera, portanto, um quadro de excesso calórico devido à elevada ingestão de macronutrientes (carboidratos, proteínas e lipídeos) e deficiência de micronutrientes (vitaminas e minerais) (Escoda, 2002).

Alguns índices antropométricos são muito utilizados para posicionar os indivíduos em diferentes classes que possam expressar o risco de desenvolvimento de doenças associadas

a distúrbios metabólicos, como a obesidade. Dentre esses índices destaca-se o IMC (índice de massa corpórea ou Índice de Quetelet), que relaciona o peso (massa corporal), em quilogramas, dividido pelo quadrado da altura, em metros. Definem-se indivíduos com "sobrepeso", aqueles que apresentam um IMC igual ou superior a 25 kg/m^2 , e com "obesidade", com um IMC igual ou superior a 30 kg/m^2 . O IMC, apesar das limitações, fornece uma medida útil para a população relativa ao excesso de peso ou obesidade, uma vez que os valores de referências são os mesmos para ambos os sexos e para adultos de todas as idades. Um outro índice utilizado é a relação cintura-quadril (RCQ), o qual determina que indivíduos eutróficos devam apresentar valores inferiores a 1 (para os homens) ou 0,85 (para as mulheres). Além da relação cintura-quadril, as classificações atuais levam em conta a circunferência abdominal dos indivíduos, e os valores limites são 102 cm para os homens ou 88 cm para as mulheres (IASO, 2010; WHO, 2013).

Um estudo epidemiológico recente mostrou que em 2008 1,4 bilhões de pessoas apresentavam excesso de peso e 400 milhões eram obesas e a previsão para 2015 é que esses valores cheguem a 3,3 bilhões e 700 milhões, respectivamente (WHO, 2013).

Nos EUA, os problemas com a obesidade não são recentes, o número de obesos entre 1980 e 2010 dobrou atingindo proporções epidêmicas. Entre 2009 e 2010, a prevalência de obesidade foi de 35,5% entre os homens adultos e 35,8% entre as mulheres adultas (Flegal, Carroll et al., 2012).

Em uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em 2011 observou-se que no Brasil a população com excesso de peso atinge 48,5% e os obesos representam 15,8% do total. Entre os homens o sobrepeso representa 52,6%. Já entre as mulheres, a prevalência de sobrepeso representa 44,7%. Estima-se também que 35% da população adulta seja obesa em 2025 (VIGITEL, 2012). As maiores prevalências de obesidade no Brasil são encontradas nas regiões mais industrializadas do país, como a região Sudeste e Sul. No entanto, o maior número de obesos é encontrado em grandes capitais, como o Rio de Janeiro, nas áreas onde há maior concentração de indivíduos com baixo poder aquisitivo (ABESO, 2009).

O preocupante é que há pouco tempo a obesidade era vista como um mal quase que restrito à população adulta e idosa, mas atualmente atinge todas as faixas etárias e esses números vêm crescendo entre os mais jovens. Dados de 1999 demonstravam que 13% das crianças entre 6 e 11 anos e 14% dos adolescentes entre 12 e 19 anos apresentavam sobrepeso. Em 2010 o número de crianças com sobrepeso foi estimado em 42 milhões, sendo que 35 milhões vivem em países em desenvolvimento e 8 milhões em países desenvolvidos. No Brasil o excesso de peso atinge 33,5% das crianças de 5 a 9 anos, sendo que 6,6% do total de meninos e 11,8% do total de meninas são obesos (Kopelman, 2000; POF, 2008-2009; WHO, 2013;).

A literatura científica atual sugere a hipótese de que a obesidade gera um ciclo vicioso, já que filhos de pais obesos têm 80 a 90% de probabilidade de serem adultos obesos (James et al., 2001; Shankar et al., 2008). Em 2005 esse distúrbio afetava cerca de 25% das mulheres norte-americanas e mais de um terço das mulheres em idade reprodutiva (Hall et al., 2005). Um estudo realizado no Reino Unido mostrou que de 15 a 20% das mulheres já iniciavam a gravidez obesas (Heslehurst et al., 2007).

No Brasil um estudo conduzido em 2001 mostrou que a prevalência de sobrepeso entre gestantes adultas era de 25% e de obesidade de 5,5% (Nucci et al., 2001). Um estudo recente mostrou que a obesidade na gravidez praticamente dobrou entre 1982-1993 e 2004 (Simmons, 2011).

Dentre os riscos obstétricos associados à obesidade estão o diabetes mellitus (pré-gestacional e gestacional), síndromes hipertensivas (hipertensão crônica e pré-eclampsia) e mortalidade neonatal (Castro e Avina, 2002; Cnattingius et al., 1998; King, 2006).

Alguns estudos mostram o período pré-natal e/ou pós-natal como momentos críticos e determinantes na maturação dos sistemas, aumentando dessa forma a suscetibilidade ao desenvolvimento de patologias em longo prazo (Waterland et al., 1999).

Assim, Van Assche et al. (1985) demonstraram que a hiperglicemia induzida por estrepto-zotocina durante a gestação em ratas *Wistar* induziu nos filhotes, aos 70 dias de vida, um aumento na resistência à insulina. Plagemann et al. (1999a) mostraram que ratos

crescidos em pequenas ninhadas com acesso a maior quantidade de alimento desenvolveram hiperfagia, hiperinsulinemia e obesidade na fase adulta.

Os estudos de Buckley et al.(2005) mostraram que as proles de mães com obesidade e hiperglicemia tinham 6 vezes mais chances de apresentarem resistência à insulina em relação aos controles. Além disso, essa prole possui cerca de 20% a mais de gordura corporal, IMC e pressão arterial mais elevada, e responde menos às oscilações de glicemia. Essas alterações foram detectáveis já no início da vida e em longo prazo, a prevalência de obesidade também é maior no grupo cujas mães apresentavam excesso de glicose circulante.

Em um estudo de coorte, conduzido no Reino Unido, mais de 900 mulheres e seus bebês foram acompanhados desde a gestação até os seis anos após o nascimento. Os autores encontraram associação direta do ganho de peso excessivo materno na gestação com maior adiposidade das crianças ao nascer, aos 4 e 6 anos, em comparação com aquelas mães que ganharam peso de forma adequada (Crozier et al., 2010).

Além disso, durante a gestação, a placenta representa uma fonte importante de citocinas e adipocitocinas. A placenta da gestante obesa é caracterizada por uma resposta inflamatória exagerada, com acúmulo de macrófagos e intensa produção de mediadores pro-inflamatórios (Challier et al., 2008).

A obesidade está associada a uma inflamação crônica de baixo grau que pode desencadear e estar associada a outros problemas de saúde como hiperlipidemia, hipertensão, hiperinsulinemia, resistência à insulina (RI), diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2), doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA), doenças cardiovasculares, cálculo biliar, disfunções respiratórias, entre outras, que são fatores presentes na chamada Síndrome Metabólica (Eckel et al., 2005; Semenkovich, 2006).

No início da década de 1990, Hotasmiligil et al.(1993) constataram o aumento da expressão do gene que codifica a citocina pró-inflamatória, denominada fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), no tecido adiposo e a redução da sensibilidade à insulina em roedores submetidos a um protocolo de obesidade induzida pela dieta. Essa inflamação

crônica presente na obesidade foi constatada através da correlação positiva entre a massa de tecido adiposo e a expressão do gene TNF- α (Beutler et al., 2006).

Após essa descoberta outras pesquisas mostraram que a obesidade está diretamente relacionada a alterações nas funções endócrinas e metabólicas do tecido adiposo. O tecido adiposo é composto por adipócitos maduros e por células da fração estromal-vascular. Essa fração inclui os pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais, histiócitos e macrófagos (Ferrante, 2007). Além disto, o tecido adiposo é um local de produção de citocinas e outras substâncias bioativas, como leptina, interleucina 6 (IL-6), resistina, proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1), inibidor do plasminogênio-1 (PAI-1), angiotensinogênio, visfatina, proteína ligante do retinol-4 (RBP-4), amiloide sérico A (SAA) e outros. A adiponectina é também produzida pelo tecido adiposo, entretanto sua expressão diminui com o aumento da adiposidade (Shoelson et al., 2006; Wajchemberg et al., 2009).

A inflamação crônica, induzida pelo excesso de gordura corporal, particularmente a obesidade visceral, é um dos fatores desencadeantes da resistência periférica à ação da insulina a qual antecede o DM2, assim como a Síndrome Metabólica (kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006).

A ocorrência da resistência periférica à ação da insulina está relacionada, em parte, ao aumento da síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-6, uma vez que essas citocinas influenciam na via de sinalização da insulina. O TNF- α inibe a fosforilação em tirosina do substrato do receptor de insulina (IRS)-1, impedindo sua ativação. Outros mecanismos de inibição da fosforilação do IRS-1 por mediadores inflamatórios incluem a ativação crônica das proteínas denominadas Jun N-terminal quinase (JNK), proteína quinase C (PKC) e quinase inibidora do IKB (IKK) (kanda et al., 2006; Weisberg et al., 2006).

Nos últimos anos, identificou-se que a resistência periférica à ação da insulina pode ser a base etiopatogênica ou fisiopatológica de outras entidades clínicas prevalentes na população, e parece estar diretamente associada à DHGNA (Duarte et al., 2010).

A DHGNA é o resultado do acúmulo de gordura no fígado, que consiste na infiltração de lipídeos no interior dos hepatócitos, não havendo outra causa para o acúmulo secundário

de gordura, como o consumo excessivo de álcool, uso de medicação esteatogênica ou de doenças hereditárias (Ludwig et al., 1980; Powell et al., 1990; Chalasani et al., 2012).

A relação entre a esteatose, inflamação e cirrose, em pacientes obesos e diabéticos, foi descrita pela primeira vez em 1958 (Westwater e Fainer, 1958), mas o termo esteatose hepática não alcoólica foi aplicado, pela primeira vez, em 1980, quando Ludwig e colaboradores descreveram a sequência clínica e histológica, caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado e os avanços da doença hepática. Os autores observaram esteatose, inflamação lobular e fibrose em biópsias de indivíduos que apresentavam fatores de risco para Esteatohepatite não alcoólica (EHNA) (Ludwig et al., 1980).

A DHGNA ainda pode ser histologicamente subclassificada em esteatose hepática não alcoólica (ESNA) e EHNA. A primeira é definida como a presença de depósitos de gordura sem dano hepatocelular; a segunda – a EHNA – é definida pela presença de esteatose hepática associada à lesão hepatocelular (balonização ou degeneração hidrópica dos hepatócitos) com ou sem fibrose. Assim, a DHGNA engloba um espectro de alterações clínico-patológicas incluindo desde a ESNA até a EHNA, podendo chegar à cirrose e até ao carcinoma hepatocelular (CHC) (Chalasani et al., 2012).

A prevalência da DHGNA é difícil de estimar, tendo em vista que a doença se apresenta de forma assintomática. Foram relatadas prevalências de 3 a 5% da população geral (Vernon et al., 2011). Com o aumento da obesidade, RI e o diabetes entre os mais jovens, e por esses fatores estarem associados ao desenvolvimento de DHGNA, os estudos em relação a essa doença aumentaram.

Oben et al (2010) mostraram que a prole de mães obesas durante a gestação e lactação apresentou maior conteúdo de triglicérides no fígado, aumento de enzimas hepáticas sinalizadoras de dano hepático e liberação de substâncias indutoras de fibrogênese hepática. McCurly et al. (2009) também mostraram que prole de mães que fizeram uso de uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação apresentaram aumento nos níveis de triglicérides hepático e, conseqüentemente, desenvolvimento de DHGNA em macacos.

Em um estudo conduzido por nosso grupo (Ashino et al., 2012) foi observado um aumento no depósito de triglicérides no fígado da prole adulta de mães submetidas à uma

dieta hiperlipídica (HFD-O), concomitante a diminuição dos níveis de triglicérides séricos, em relação a prole de mães controle (SC-O). O mesmo estudo ainda mostrou que a enzima Lípase Hormônio Sensível (HSL), responsável pela mobilização e hidrólise de triglicérides, apresentou redução na fosforilação do resíduo de serina 565 (responsável por sua inativação), concomitante ao aumento no nível de ácidos graxos livres no soro da prole HFD-O quando comparado com o grupo SC-O, indicando que o fluxo de ácidos graxos para o fígado apresentava-se aumentado nesses animais. Em conjunto, esses dados sugerem uma possível alteração na oxidação hepática de ácidos graxos, assim como um possível defeito na exportação de triglicérides do fígado, que pode estar relacionado com a redução da capacidade do fígado para secretar VLDL.

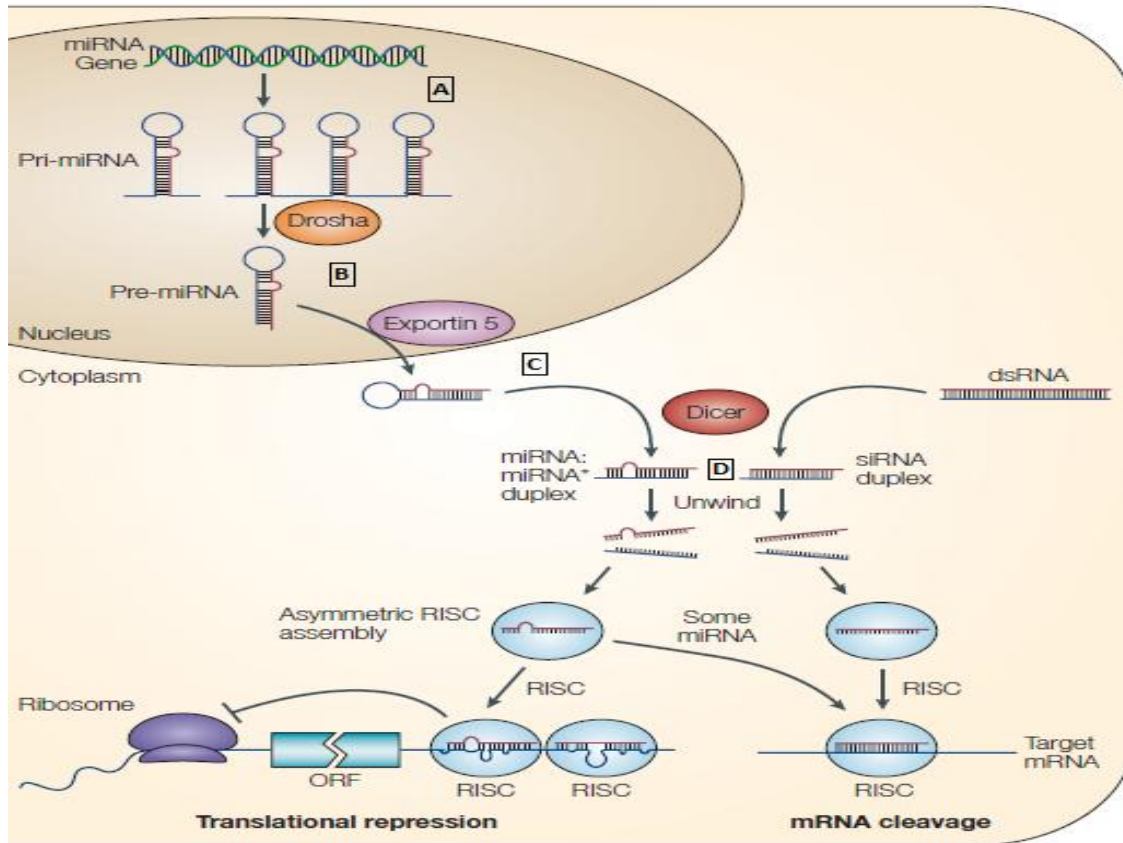
Sabe-se que estímulos nutricionais, como a dieta, podem ter influências permanentes na expressão de vários genes por interagir com mecanismos epigenéticos que alteram a conformação da cromatina e a acessibilidade dos fatores de transcrição (Gallou-Kabani et al., 2005).

O termo epigenética (*epi* do grego que significa “posto, colocado”) é definido como alterações hereditárias na expressão do gene, sem uma mudança na sequência de DNA (Egger et al., 2004). A Metilação do DNA e as modificações das histonas são dois mecanismos importantes na área da epigenética que têm papéis na regulação gênica, desenvolvimento e carcinogênese (Jones et al., 2002). Os microRNAs também podem desempenhar um papel importante no controle de metilação do DNA e modificações das histonas. Um estudo mostrou que o miR-165 e miR-166 são necessários para a metilação no gene PHABULOSA (PHB) em *Arabidopsis* (Bao et al., 2004).

MicroRNAs (miRNAs) fazem parte do grupo dos pequenos RNAs que não codificam proteínas e que apresentam função na regulação pós-transcricional da expressão gênica, através da inibição traducional ou pela degradação do RNAm pela ligação à região 3' não traduzida (3'-UTR) de RNAs mensageiros-alvos (Wilfred; Wang; Nelson, 2008). Em sua forma de atuação (madura) os miRNAs possuem aproximadamente de 19 a 25 nucleotídeos de extensão e podem ser transcritos a partir de genes específicos ou de determinadas regiões gênicas que não estão associadas à produção de proteínas (íntrons) (Rodriguez, et al., 2004).

O processo de maturação dos miRNAs se inicia no núcleo e se estende ao citoplasma (figura 1). Eles são transcritos pela RNA polimerase II ou III dando origem ao transcrito primário longo com estrutura em grampo, o pri-miRNA, o qual possui de centenas a milhares de nucleotídeos (Bartel, 2004; Winter, et al., 2009). Os pri-miRNA são clivados ainda no núcleo pela Drosha e seu cofator DGCR8 (do inglês *DiGeorge syndrome critical region gene 8*), gerando uma molécula precursora do miRNA maduro denominada pré-miRNA, com cerca de 70 nucleotídeos (Lee, et al., 2003). Após a formação o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5), proteína de exportação nuclear que utiliza Ran-GTP como cofator. No citoplasma, o pré-miRNA é processado pelo complexo enzimático *Dicer*, perdendo a configuração em grampo e originando duas fitas simples de miRNA de aproximadamente 22 nucleotídeos. Uma das fitas se liga a uma proteína Argonauta 2 e é preferencialmente acoplada ao complexo de proteínas que reprime a expressão do gene alvo, o RISC (*RNA-induced silencing complex*), enquanto a outra é degradada (Bartel, 2004; Lee et al., 2006; Siomi e Siomi, 2010).

As enzimas DROSHA e DICER realizam a clivagem do pri e pré-miRNA, respectivamente, e são essas clivagens que definem as extremidades do dímero miRNA:miRNA. A fita que possuir a menor energia livre na extremidade 5' será incorporada pelo complexo RISC (Khvorova et al., 2003). Assim o miRNA incorporado à estrutura RISC é guiado para o RNA mensageiro que contenha sequências complementares; se o pareamento for completo haverá a clivagem do mRNA, se o pareamento for parcial, haverá a inibição da tradução (Cannell et al., 2008).



He & Hannon (2004)

Figura1: Biogênese dos microRNAs. A)Transcrição do gene MIR gerando o pri-miRNA com estrutura secundária em *hairpin*; B) Formação do pré-miRNA pela clivagem do pri-miRNA pela DROSHA; C) Transporte do pré-miRNA pela exportina-5 para o citoplasma; D) Clivagem pela DICER dos pré-miRNAs formando o miRNA maduro.

Os primeiros relatos de miRNAs datam de 1993, em publicações dos grupos de Rosalind Lee, Victor Ambros e Rhonda Feinbaum, a partir da identificação de uma pequena região não-codificadora (*lin-4*), específica do nematódio *Caenorhabditis elegans*, que atua na regulação negativa dos níveis da proteína Lin-14, característica do desenvolvimento larval dessa espécie (Bartel, 2004). Os pesquisadores acreditavam que esse era um mecanismo de regulação específico do *C. elegans*. Porém, posteriormente, a descoberta do *let-7*, outro miRNA envolvido com o tempo de desenvolvimento do *C.elegans* (Reinhart et al., 2000), o qual é conservado em uma grande variedade de organismos multicelulares, demonstrou que a regulação da expressão gênica pelos miRNAs

não é restrita aos nematóides, sendo um mecanismo presente em muitos animais (Pasquinelli et al., 2000).

Os miRNAs, podem regular pelo menos 1/3 de todos os genes humanos e apresentam expressão tecido e tempo-específica, logo, suas funções são específicas em determinados órgãos e tecidos e em determinadas épocas do desenvolvimento (Lagos-Quintana et al., 2002; Bartel, 2004). Além disso, a expressão de diversos miRNAs tem sido associada à regulação do crescimento, diferenciação e morte celular e, especialmente, ao metabolismo energético, incluindo a homeostase da glicose e o metabolismo lipídico.

Neste sentido, vários estudos tem mostrado que a modulação da expressão de miRNA resulta em significativa alteração de eventos fisiológicos. Um exemplo disso foi a descoberta de que miR-375 atua na regulação da secreção do hormônio insulina em células β de pâncreas de camundongos, inibindo a expressão de miotrofina, uma proteína citoplasmática que induz a exocitose de grânulos de insulina (Poy et al., 2004). Outros dois miRNAs, miR-124 e let-7b, que são altamente expressos nas ilhotas, atuam em conjunto com miR-375 no controle da expressão da miotrofina, mostrando também um exemplo de atuação de vários miRNAs na tradução de uma única proteína (Krek et al., 2005).

Em modelos animais de obesidade e em humanos obesos, miR-27 e miR-335 encontram-se mais expressos no fígado e tecido adiposo (Takanabe et al., 2008; Lin et al., 2009; Nakanishi et al., 2009). De acordo com Nakanishi e col. (2009) o aumento na expressão de miR-335 em fígado e tecido adiposo branco de animais ob/ob, db/db e KKAY foi concomitante ao maior ganho de peso corpóreo e adiposidade, além de aumento nos níveis de triglicérides e colesterol hepáticos.

Outro microRNA que tem sido apontado como regulador dos níveis de lipídios circulantes em indivíduos obesos e que apresentam esteatose hepática é o miR-122.

miR-122 é um miRNA conservado entre as espécies de vertebrados e ausente nos invertebrados (Filipowicz e Grosshans, 2011). Postula-se que miR-122 represente 70-75% do total de miRNA expressos no fígado adulto, sendo considerado um importante miRNA tecido-específico responsável pela manutenção do estado de diferenciação e do controle metabólico do tecido (Esau et al., 2006; Jopling, 2012). Apesar de ser um miRNA tecido-

específico, um estudo recente mostrou que o miR-122 também está presente em fibroblastos de pele humana (Burns et al., 2011).

A expressão de genes que são tecido-específicos são geralmente controlados por fatores de transcrição. Portanto, supõem-se que o miR-122 possa ser transcrito por ativação dos fatores nucleares hepáticos (HNFs) e das CCAAT/proteínas potenciadoras de ligação(C/EBP) α , que desempenham um papel central na regulação da expressão específica de genes hepáticos (Schrem, 2002). Um estudo realizado por Xu e colaboradores (2010) mostrou que, em camundongos, quatro fatores de transcrição se ligam à região promotora do miR-122 e ativam sua expressão. Os fatores de transcrição são HNF1 α , HNF3 β , HNF4 α e as CCAAT/proteínas potenciadoras de ligação(C/EBP) α .

O miR-122 desempenha um papel muito importante no ciclo de vida do vírus da hepatite C (HCV). Ele interage com o vírus através de dois locais de ligação localizadas na extremidade 5' do RNA genômico do vírus HCV. Essa função do miR-122 ainda é incompreendida, mas é essencial para a replicação do vírus (Jopling, 2005). Assim, estudos mostraram que a administração intravenosa de um antisense para miR-122 reduz a carga viral do HCV em chimpanzés infectados (Lanford, 2010), uma abordagem terapêutica que está atualmente sob investigação clínica para aplicação em seres humanos.

Além disso, a expressão do miR-122 está relacionada com o carcinoma hepatocelular (CHC) que ocorre frequentemente quando há disfunção hepática, inflamação crônica e cirrose. Estudos mostraram que a expressão do miR-122 é reduzida durante a iniciação e progressão da hepatocarcinogênese em ratos com EHNA (El-Serag et al., 2011) e em pacientes humanos com DHGNA (Kutay, et al., 2006).

De acordo com Iliopoulos et al. (2010), a expressão de miR-122 é controlada por miR-370, um microRNA que tem como alvo o RNAm do gene da Carnitina Palmitoil Transferase 1 (CPT1), levando à redução da expressão dessa importante enzima envolvida na oxidação de ácidos graxos. Também de acordo com a literatura, este miRNA possui funções semelhantes ao do miR-122 na regulação do metabolismo de lipídeos.

Vários autores demonstraram que miR-122 induz a expressão de genes lipogênicos, ativando inicialmente o *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins 1c* (SREBP-1c) e a

Diacilglicerol Aciltransferase 2 (DGAT2) e, subsequentemente, a Ácido Graxo Sintase (FAS) e a Acetil CoA Carboxilase (ACC1).

Interessantemente este microRNA tem sido apontado como regulador dos níveis de lipídios circulantes em indivíduos obesos e com esteatose hepática (Esau et al., 2006), condições patológicas associadas a dislipidemias. Neste sentido é interessante citar que um importante fator de transcrição nuclear, o HNF4 α , é modulado pela ligação de ácidos graxos de cadeia longa (Gonzalez, 2008) e é capaz de estimular a expressão de miR-122 no fígado (Li et al., 2011). Trabalhos recentes apontam para a participação de outros microRNAs nesse mesmo processo, tais como o miR-370, miR-378, miR-335, miR-125a-5p e miR-33 (Moore et al., 2011).

Contudo, a participação do miR-122 neste processo ainda é controversa, desde que os estudos realizados por Cheun et al. (2008) demonstraram que miR-122 encontra-se significativamente diminuído em pacientes com EHNA e os níveis de RNA mensageiro (RNAm) de SREBP-1c, FAS e 3-hidroxi-3-metil glutaril coenzima A redutase (HMGCR) significativamente aumentados. Esse estudo também mostrou que a inibição do miR-122 em cultura de células acarreta um aumento do RNAm de SREBP-1c, FAS e HMGCR, assim como a superexpressão desse miRNA leva a uma diminuição do RNAm de SREBP-1c, FAS e HMGCR.

A FAS é uma enzima citosólica de 270 kDa, também conhecida como complexo multienzimático FAS e sua função é catalisar a conversão de malonil-CoA em palmitato. É expressa no fígado e no tecido adiposo em resposta a um aumento na disponibilidade de nutrientes, especialmente carboidratos provenientes da dieta (Kusakabe et al., 2000). Esta enzima tem sua síntese estimulada a partir da carboxilação da acetil-CoA a malonil-CoA, catalisada pela enzima ACC que possui 257 kDa. A atividade da ACC é modulada negativamente pela atividade serina-quinase da AMPK, que fosforila a ACC inativando-a. Na célula, a AMPK atua como um sensor energético intracelular e sua atividade é regulada pela razão AMP/ATP. Assim em estado alimentado a insulina modula negativamente a AMPK, inativando-a e inibindo a síntese de ácidos graxos e a síntese de colesterol, e em condições de jejum a AMPK é ativada e induz a glicólise e a oxidação de ácidos graxos (Hardie et al., 1999).

Em mamíferos a biossíntese do colesterol, a síntese de ácidos graxos e triglicérides são regulados pela família de fatores de transcrição conhecidas como *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* (SREBPs). A expressão da FAS é regulada pelo SREBP-1c. Outros membros dessa mesma família, SREBP2 e SREBP1a regulam a transcrição de genes envolvidos com o metabolismo de colesterol, como o gene da HMGCR, enzima que catalisa o passo regulatório da biossíntese de colesterol convertendo o HMG-CoA a mevalonato e do receptor de LDL, responsável por internalizar o colesterol plasmático. (Moore et al., 2011).

Outra importante enzima relacionada ao metabolismo de ácidos graxos é a SCD1. A SCD1 é responsável por converter os ácidos graxos saturados palmitato (16:0) e estearato (18:0) nos ácidos graxos monoinsaturados palmitoleato (16:1n-7) e oleato (18:1n-9), respectivamente (Hulver et al., 2005). Os ácidos graxos monoinsaturados, como palmitoleato e oleato, são substratos preferenciais para a síntese de triacilgliceróis. Dessa forma, um aumento na razão de monoinsaturados/saturados, aumenta a propensão ao armazenamento de gordura, sendo, portanto, a atividade da SCD1 um marcador da lipogênese.

Em contrapartida à via de síntese, em estado não alimentado (jejum) a via de oxidação dos ácidos graxos é ativada. Uma enzima muito importante para oxidação dos ácidos graxos é a Carnitina Palmitoil Transferase 1 (CPT-1) cuja função é catalisar a conjugação dos ácidos graxos a carnitina, formando o complexo Acil-carnitina, permitindo assim a entrada para o interior da mitocôndria (Bonfont et al., 2004). Outra enzima muito importante é a Acil Coenzima A Desidrogenase (ACAD) que está localizada na membrana mitocondrial interna e catalisa o primeiro passo da β -oxidação, onde converte um FAD em FADH₂, levando à oxidação do Acil-CoA em enoil-CoA (Strauss et al., 1995).

Apesar do grande número de estudos que procuram compreender os mecanismos bioquímicos e fisiológicos por trás das patologias associadas à obesidade, poucos estudos avaliam a contribuição de microRNAs na regulação do metabolismo lipídico e na homeostase da glicose na prole de mães obesas. Vários achados apontam para a evidência de que a diminuição na expressão de miR-122 no fígado contribuem para a patofisiologia da obesidade em indivíduos com esse fenótipo.

Dessa forma, a compreensão da participação dos microRNAs no desenvolvimento de obesidade na vida adulta de prole de indivíduos submetidos à dieta rica em gordura durante períodos críticos do desenvolvimento, como gestação e lactação, pode servir como prevenção precoce e como base para a descoberta de alvos terapêuticos para o tratamento dessa desordem.

OBJETIVOS

Objetivo geral: Avaliar a expressão de microRNAs e a modulação de proteínas envolvidas com o metabolismo lipídico hepático na prole de mães com obesidade induzida por dieta hiperlipídica.

Objetivos específicos: Avaliar na prole de mães magras e mães obesas:

- A evolução do peso corpóreo e adiposidade;
- A glicemia, trigliceridemia, colesterolemia, concentração de ácidos graxos livres no soro e triglicérides hepáticos;
- A expressão de miR-370, miR-122 e do fator de transcrição HNF4 α no tecido hepático;
- A modulação de proteínas no fígado envolvidas com síntese de ácidos graxos (FAS, ACC, SCD1), triglicérides (GPAM) e colesterol (HMG-CoA redutase) e com a oxidação de ácidos graxos (AMPK, CPT-1 e ACADVL);

CAPÍTULO 1

Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and miR-122 and miR-370 expression in offspring

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

¹Faculdade 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

Key words: lipid metabolism, maternal imprint, obese mice, high-fat diet, microRNA

Running Title: Maternal diet modulates hepatic metabolism

Abbreviations: HFD, High-fat diet; HFD-O, Offspring of dams fed high-fat diet; SC-O, Offspring of dams fed standard chow

*Correspondence address:

Adriana S. Torsoni

Faculdade de Ciências Aplicadas da Universidade Estadual 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: adriana.torsoni@fca.unicamp.br

Abstract

Maternal consumption of high-fat diet (HFD) during pregnancy and lactation is closely related to liver lipid accumulation, insulin resistance, and increased serum cytokines in offspring and into adulthood. MicroRNAs (miRNAs) have been implicated in cholesterol biosynthesis and fatty acid metabolism. We evaluated the modulation of hepatic fatty acid synthesis (de novo), beta-oxidation pathways and miR-122 and miR-370 expression in recently weaned offspring (d28) of mice dams fed HFD (group HFD-O) or standard chow (group SC-O) during pregnancy and lactation. Compared with SC-O mice, HFD-O mice weighed more, had a larger adipose tissue mass and were more intolerant to glucose and insulin. HFD-O mice also presented more serum cholesterol, triglycerides, non-esterified fatty acids and hepatic IKK and JNK phosphorylation compared with SC-O mice. Protein levels of FAS, ACC and HMGCR were similar in HFD-O and SC-O mice, whereas SCD1 mRNA and protein were more abundant in HFD-O mice compared with SC-O mice. Interestingly, mRNA expression of β -oxidation-related genes ACADVL and CPT1 was decreased in HFD-O mice. Although we did not observe a difference in hepatic HNF4 α levels, the expression of miR-122 was reduced but that of miR-370 was increased in HFD-O mice compared with that in SC-O mice. Changes in hepatic lipid metabolism were accompanied by increased triglyceride deposition in HFD-O mice. Taken together, our results strongly suggest that maternal consumption of HFD affects the early lipid metabolism of offspring by modulating the expression of hepatic β -oxidation-related genes and miRNAs that can contribute to metabolic disturbances in adult life.

Introduction

Maternal obesity predisposes offspring to metabolic disorders. Nutritional overload during early or prenatal life can cause permanent damage to offspring^(1; 2; 3). Consumption of a high-fat diet (HFD) during pregnancy and lactation leads to macrophage activation in the maternal placenta that culminates in an inflammatory environment for foetal development⁽⁴⁾. Maternal body weight gain during critical phases of offspring development results in greater adiposity, body weight, liver triglyceride (TG) content and hepatic

steatosis in adult life ^(5; 6). Furthermore, the uterus and blastocysts from obese dams exhibit inflammatory signals linking maternal obesity to increased predisposition of offspring to obesity later in life ⁽⁷⁾.

Liver steatosis is characteristic of obesity and diabetes and is closely associated with inflammatory signals ^(8; 9). Maternal HFD during pregnancy results in increased foetal hepatic lipid accumulation, oxidative stress and apoptosis in a non-human primate model of maternal obesity ⁽¹⁰⁾. Recently we observed that offspring of obese dams displayed increased fatty liver deposition immediately after weaning and into adulthood ⁽⁶⁾. In addition, Heerwagen et al. showed that E18.5 foetuses of obese dams had higher foetal liver TG deposition than foetuses of lean dams ⁽¹¹⁾. The metabolic pathways leading to the development of hepatic steatosis are multiple, including enhanced non-esterified fatty acid release from adipose tissue (lipolysis), increased de novo fatty acid synthesis (lipogenesis) and decreased beta-oxidation ^(12; 13).

Epigenetic mechanisms have been associated with metabolic imprinting of and damages to adulthood offspring ^(14; 15). MicroRNAs (miRNAs) are endogenous non-coding RNAs approximately 22 nucleotides (nt) in length that regulate various metabolic processes and diseases ⁽¹⁶⁾. miRNA-122 (miR-122) is liver-specific and the most abundant miRNA in this organ, accounting for approximately 70% of the total miRNA population. Functional studies show that miR-122 is involved in multiple metabolic processes including cholesterol biosynthesis, fatty acid synthesis and oxidation ⁽¹⁷⁾. Repression of miR-122 results in hepatic insulin resistance by PTP1B induction ⁽¹⁸⁾, similar to repression of miR-370. Iliopoulos et al. showed that miR-370 directly downregulated the expression of the gene encoding carnitine palmitoyl transferase 1 α (CPT1 α), which controls fatty acid oxidation ⁽¹⁹⁾. Therefore, miRNAs may contribute to the induction of metabolic damage associated with fatty liver deposition in offspring of obese dams. We used offspring mice recently weaned from obese dams to investigate the modulation of hepatic fatty acid synthesis (de novo), beta-oxidation pathways, and expression of miR-122 and miR-370 by maternal consumption of HFD during pregnancy and lactation.

Materials and Methods

Ethics Statement

All experiments were performed in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and approved by the Committee for Ethics in Animal Experimentation (protocol number 2864-1) at the State University of Campinas – UNICAMP (Campinas, SP, Brazil).

Animals

Ten virgin female and male Swiss mice (7-weeks-old) were obtained from the Animal Breeding Center at the University of Campinas (Campinas, SP, Brazil) for mating. Before mating, the females were randomly fed ad libitum either an HFD or standard laboratory chow (SC) for 2 weeks for adaptation (Table 1).

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

	Chow Diet (g/%)¹	High-fat Diet (g/%)
Net protein^a	22.5	20.8
Ether extract (Fat content)^b	4.5	23.6
Carbohydrates^c	55.0	41.2
Fibrous matter	8.0	5.8
Ash matter	10.0	8.6
Total	100.0	100.0
Kcal/g	3.5	4.6

¹(NUVILAB® Cr-1, Nuvital, PR - Brazil)

(a) Font Protein: Casein commercial (approximately 85% protein).

(b) Fraction lipid: Diet Control - soybean oil; fat diet = soybean oil and lard.

(c) Fraction carbohydrate: starch, dextrinised starch and sucrose.

Mating was performed by housing females with adult males (fed SC) for 1 week. Pregnant females were maintained in individual polypropylene cages in a room at 22°C ± 1°C with lights on from 6:00 a.m. to 6:00 p.m. They received the same diet (HFD or SC) during pregnancy and lactation as before mating. HFD was prepared according to the AIN-93G modified for high fat (45%) content (Table 1). Offspring were divided into two groups according to maternal feeding: offspring of female mice fed HFD (group HFD-O) and offspring of female mice fed SC (group SC-O). One day (d1) after birth, the litters of both groups (HFD-O and SC-O) were adjusted to eight pups each. The pups were weaned on d18 and separated according to sex. Male offspring were fed SC after weaning until the end of the experimental period (d28).

Biochemical Analysis

At the end of the experimental period (d28) and after overnight fasting, all mice were sacrificed, blood samples were collected and centrifuged, and serum aliquots were used to measure levels of serum TGs (GPO-PAP, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), cholesterol (CHOD-PAP, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) and non-esterified fatty acids (ACS-ACOD, Wako Chemicals, Neuss, Germany) by enzymatic colorimetry.

Frozen tissues (200 mg) from SC-O and HFD-O specimens were homogenized in 1.5 ml of phosphate-buffered saline and processed as described by others^(20; 21). The protein concentration of the homogenate was determined, and an aliquot of 300 µl was extracted with 5 ml of chloroform/methanol (2:1) and 0.5 ml of 0.1% sulphuric acid. An aliquot of the organic phase was collected, dried under nitrogen and resuspended in 2% Triton X-100. TG content was determined using a commercially available kit (GPO-PAP, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Intraperitoneal Glucose Tolerance test (GTT) and Intraperitoneal Insulin Tolerance test (ITT)

For GTT, offspring of HFD and SC mice at d28 were starved for 12 h, fed for 2 h and starved for an additional 4 h before i.p. injection of glucose (1 g/kg of a 25% solution of D-glucose) as described by ⁽²²⁾. Blood samples were collected from the tail 0, 10, 15, 30, 60 and 120 min after injection for measurement of blood glucose. The area under the curve of glycemia vs time was calculated above each individual baseline (basal glycemia) to estimate glucose tolerance.

For ITT, insulin (1,0 IU/Kg body weight) was administered by i.p. injection, and tail blood samples were collected 0, 3, 6, 9, and 12 min after insulin administration to mice (d28), following the same fasting protocol. The constant for the glucose disappearance rate during the test ⁽²³⁾ was calculated using the formula $0.693/t_{1/2}$ ⁽²²⁾.

For both GTT and ITT, glycemia was determined on an Accu-Chek Performa glucometer (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland).

Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total hepatic RNA was extracted using Trizol reagent (Life Technologies Corporation, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations. Total RNA was quantified on a Nanodrop ND-2000 (Thermo Electron, WI, USA) and its integrity verified by agarose gel electrophoresis. Reverse transcription was performed with 3 µg of total RNA and a High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies Corporation, CA, USA). Relative expression was determined using the Taqman detection system and primers for the target genes: Mm 00772290_m1 SCD1, Mm 01282499_m1 HMGCR, Mm 01304277_m1 ACACA, Mm 00662313_m1 FASN, Mm 00833328_m1 GPAM, Mm 01247712_m1 HNF4 α , Mm 00444293_m1 ACADVL, Mm 01231183_m1 CPT1 α , Mm 01296700_m1 AMPK (Life Technologies Corporation, California, USA) and GAPDH as the endogenous control (4352339E mouse GAPD, Life Technologies Corporation, CA, USA). Each PCR contained 20 ng of cDNA.

Gene expression was quantified by real-time PCR performed on an ABI Prism 7500 Fast platform. Data were analyzed using the Sequence Detection System 2.0.5 (Life Technologies Corporation, CA, USA) and expressed as relative values determined by the comparative threshold cycle (Ct) method ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) according to the manufacturer's recommendation.

miRNA isolation and quantification

MicroRNA was extracted and purified from SC-O and HFD-O liver using a mirVana miRNA Isolation Kit (Life Technologies Corporation, CA, USA). The relative expression of miR-122 and miR-370 was determined using the TaqMan detection system (Life Technologies Corporation, CA, USA), the appropriate primers (ID 002245 and 002275, respectively) and U6snRNA (ID 001973) and miR-16 (ID 000391) as endogenous controls (Life Technologies Corporation, CA, USA). Gene expression was quantified as described in the preceding section.

Immunoblotting

Tissue samples (d28) were 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 of the supernatant was determined by 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. Antibodies to phospho-JNK (SC-1648), FAS (SC-20140), HMGCR (SC-33827), CPTI (SC98834), ACADVL (SC-376239) and HNF4 α (SC-8987) were obtained from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Antibodies against

phospho-ACC (3661S), ACC (3676S), phospho- AMPK (2535S) and AMPK (2532S) were obtained from Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA). Antibodies against β -actin (ab8227) and SCD1 (ab19862) were obtained from Abcam (Cambridge, MA, USA).

After incubation with specific antibodies, the blots were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Proteins recognized by the secondary antibodies were detected by chemiluminescence (Amersham ECL kit (RPN 2232, Buckinghamshire, UK) as visualized by exposure of the blot to 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 β -actin.

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 Scion Image software (ScionCorp). Student's t-test of unpaired samples was employed for determining a significance level of $p < 0.05$.

Results

To examine the effects of maternal HFD-induced obesity on offspring metabolism and microRNA expression, we first characterized our experimental model. As shown in Table II, body composition was evaluated. On d1, the body weights of SC-O and HFD-O mice did not differ significantly. At d28, HFD-O mice were significantly heavier (approximately 1.3-fold) than SC-O mice. In addition, HFD-O mice had larger epididymal (3.1-fold) and retroperitoneal (2.0-fold) fat pads than SC-O mice (Table II).

Table II: Body composition of SC-O and HFD-O mice

	d1BW (g)			d28BW (g)			eWAT (g)			rWAT (g)		
	Mean	SEM	<i>n</i>	Mean	SEM	<i>n</i>	Mean	SEM	<i>n</i>	Mean	SEM	<i>n</i>
SC-O	2.02	0.02	40	16.76	0.49	24	0.06	0.008	19	0.02	0.007	10
HFD-O	2.06	0.03	32	21.88	0.47*	22	0.18	0.014*	21	0.04	0.004*	20

SC-O, Offspring of dams fed standard chow; HFD-O, Offspring of dams fed high-fat diet; BW, Body weight at 1st (d1) and 28th (d28) postnatal day; eWAT, Epididymal white adipose tissue; rWAT, Retroperitoneal white adipose tissue.

* $p \leq 0, 05$ to SC-O vs HFD-O.

In agreement, maternal consumption of HFD during pregnancy and lactation resulted in glucose intolerance in offspring, as indicated by area under the curve in GTT and κITT calculated from the ITT (Table III). In addition, serum components such as cholesterol, TGs and non-esterified fatty acids were more abundant in HFD-O mice than in SC-O mice (Table III).

Table III: Metabolic parameters of SC-O and HFD-O (d28) mice

	CHO (mg/dL)		NEFA (mg/dL)		TG (mg/dL)		HTG (µg/mg of tissue)		AUC (mg/dL/120')		κITT (%/min)	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
SC-O^a	119.40	6.01	24.03	2.10	42.64	5.20	5.20	0.50	11865	6.30	12.02	4.05
HFD-O^a	168.30	6.63 *	40.90	1.75 *	104.80	7.10 *	7.80	0.80*	15096	5.00 *	7.57	1.72 *

SC-O, Offspring of dams fed standard chow; HFD-O, Offspring of dams fed high-fat diet; CHO, Serum cholesterol; NEFA, Non-esterified fatty acid; TG, Serum Triglycerides; HTG, Hepatic Triglycerides; AUC, Area under curve of glucose tolerance test; κITT, index of the insulin tolerance test.

^a*n*= 6-12 pups per group

* $p \leq 0, 05$ to SC-O vs HFD-O.

Because HFD consumption leads to peripheral inflammation and defective regulation of energy homeostasis ⁽⁶⁾, proinflammatory pathways in the liver were investigated (d28). As

shown in Fig. 2, hepatic IKK phosphorylation and hepatic JNK phosphorylation were higher in HFD-O mice than in SC-O mice (4.0-fold and 4.3-fold, respectively) (Fig. 2A and B).

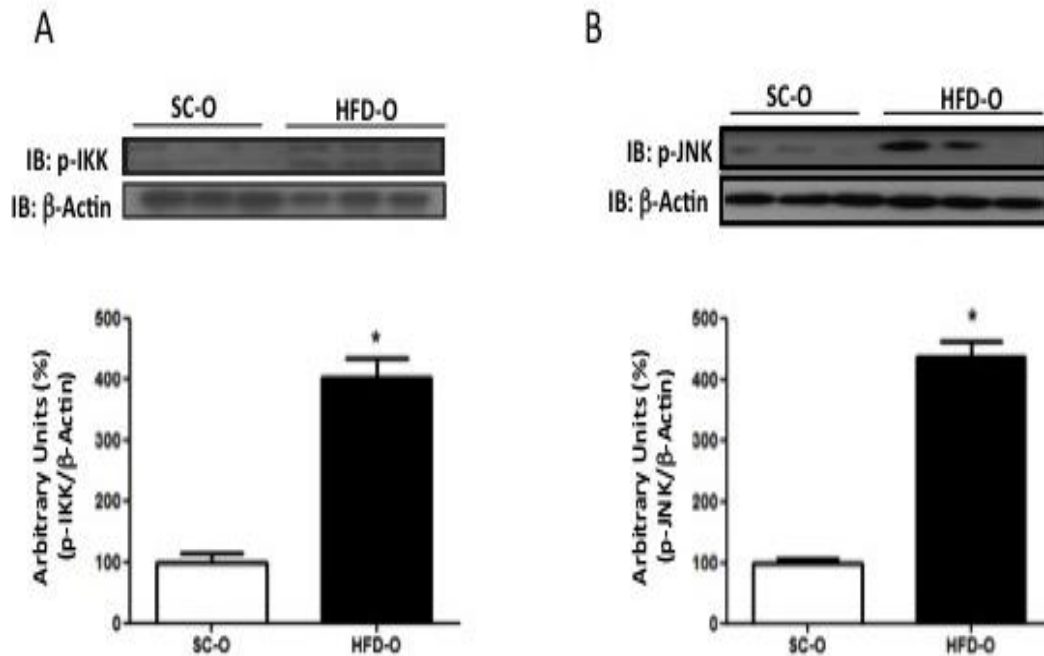


Figure 2: Western blotting (WB) of hepatic pIKK (A) and pJNK (B) in mice (d28). For control of gel loading in WB, membranes were reblotted with β -actin. Data are means \pm SEM (n = 4–7). * $p \leq 0.05$ vs SC-O.

We next investigated the influence of maternal obesity on lipogenic gene expression in offspring. HFD-O and SC-O mice expressed similar levels of hepatic phospho-ACC, FAS and HMGCR and ACC, FASN and GPAM mRNA (Fig. 3A, C–E). However, HFD-O mice expressed more hepatic SCD1 protein and mRNA (2.2-fold and 3.0-fold, respectively) than SC-O mice (Fig. 3B and E), and HMGCR mRNA levels were reduced (Fig. 3E).

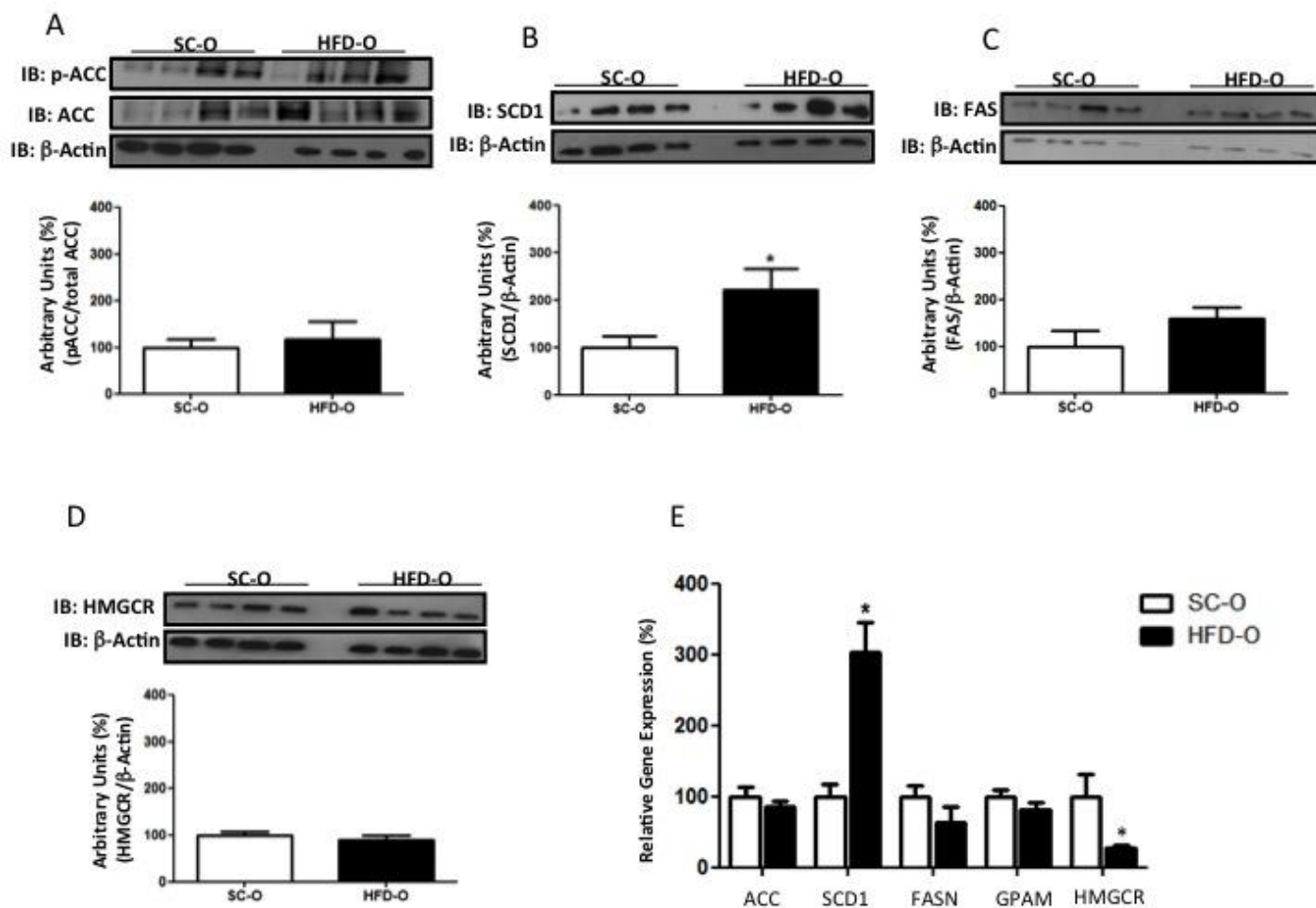


Figure 3: Western blotting (WB) of hepatic pACC/ACC (A), SCD1 (B), FAS (C) and HMGCR (D) in mice (d28). For control of gel loading in WB, membranes were reblotted with β -actin. mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic ACC, SCD1, FASN, GPAM and HMGCR (E) in mice (d28). For relative gene expression analysis, GAPDH was used as endogenous control. Data are means \pm SEM (n = 4 for WB and n = 8–12 for qRT-PCR). *p \leq 0.05 vs SC-O.

To evaluate the influence of maternal obesity on β -oxidation-related gene expression in offspring, AMPK phosphorylation and ACADVL and CPT1 expression were determined. As shown in Fig. 4A, hepatic AMPK phosphorylation was similar in SC-O and HFD-O mice (d28). However, levels of ACADVL protein and mRNA and CPT1 mRNA were lower in HFD-O mice than in SC-O mice (reductions were 75%, 30% and 40%,

respectively) (Fig. 4B, C). In contrast, AMPK mRNA levels were higher (1.3-fold) in livers of HFD-O mice than in livers of SC-O mice (Fig. 4C). Interestingly, HFD-O mice had an increased hepatic TG content (1.5-fold) compared with SC-O mice (Table III).

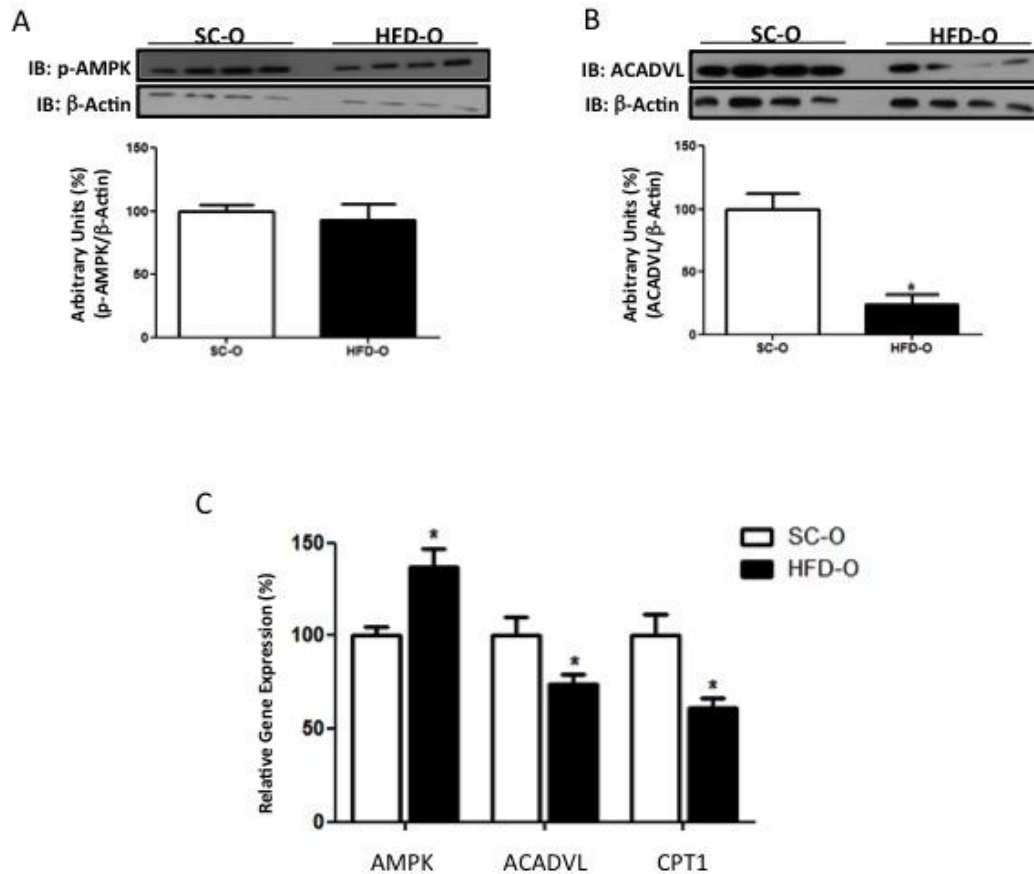


Figure 4: Western blotting (WB) of hepatic pAMPK (A) and ACDAVL (B) in mice (d28). For control of gel loading in WB, membranes were reblotted with β -actin. mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic AMPK, ACADVL and CPT1 (C) For relative gene expression analysis, GAPDH was used as endogenous control. Data are means \pm SEM (n = 4 for WB and n = 8 for qRT-PCR). * $p \leq 0.05$ vs SC-O.

In addition to transcription factors, microRNA can also modulate hepatic fatty acid metabolism. Compared with SC-O mice, HFD-O mice expressed similar levels of hepatic

HNF4 α protein and mRNA (Fig. 5A, B), reduced (25%) levels of hepatic miR-122 (Fig. 5C) and increased (3-fold) levels of miR-370 (Fig. 5D).

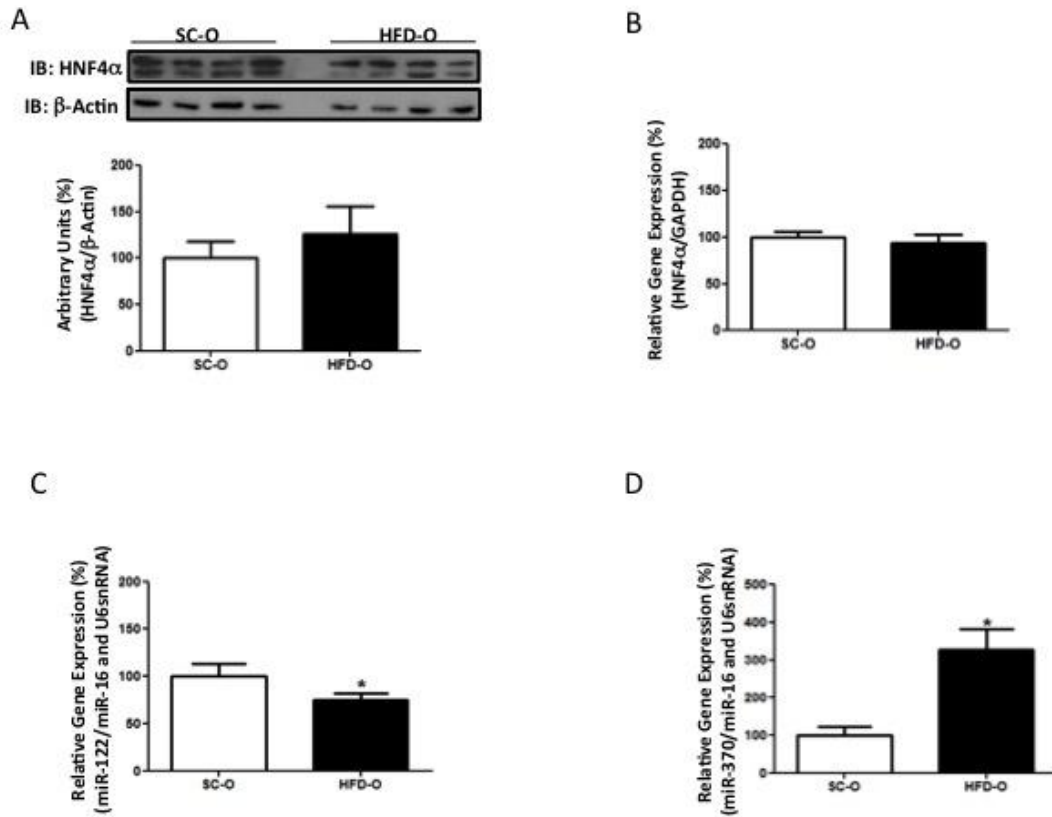


Figure 5: Western blotting (A) and mRNA levels (B) of hepatic HNF4 α . MicroRNA levels of hepatic miR-122 (C) and miR-370 (D) in mice (d28). For control of gel loading in WB, membranes were reblotted with β -actin. For relative gene expression analysis, GAPDH, miR-16 and U6snRNA were used as endogenous controls. Data are means \pm SEM (n = 4 for WB and n = 8–9 for qRT-PCR). *p \leq 0.05 vs SC-O.

Discussion

It has been demonstrated that high fat consumption activates pro-inflammatory pathways, causes endoplasmic reticulum stress, ectopic lipid deposition and insulin

resistance and contributes to other comorbidities associated with obesity^(24; 25; 26; 27; 28; 29; 30). Moreover, maternal consumption of HFD during pregnancy and lactation has also been related to metabolic disturbances in adult offspring^(10; 31; 7; 6).

Hepatic damage associated with metabolic changes promoted by maternal consumption of HFD during pregnancy and lactation has been described in offspring at different periods of development^(10; 13; 6; 11). Fatty liver is characteristic of obesity and diabetes and is closely associated with inflammatory signals^(8; 9). As shown here, HFD-O mice weighed more and had a larger adipose tissue mass than SC-O mice and were more glucose- and insulin-intolerant. HFD-O mice expressed more hepatic phospho-JNK and phospho-IKK than SC-O mice, suggesting that liver insulin resistance may be associated with activation of pro-inflammatory pathways, as described previously^(32; 33; 27). However, recent conflicting findings question the importance of hepatic inflammation in the development of insulin resistance. Wiedemann et al.⁽³⁴⁾ showed that adipose tissue inflammation contributed to HFD-induced hepatic insulin resistance, whereas Turner et al.⁽³⁵⁾ found that consumption of HFD for 3–4 weeks induced insulin resistance without evidence of inflammation in liver, adipose tissue or skeletal muscle. Moreover, they detected adipose tissue inflammation only after 16 weeks of HFD consumption. Interestingly, TG content and amount of a diacylglycerol species was increased in liver after 1 week of HFD consumption, whereas changes in ceramide abundance occurred only after development of insulin resistance⁽³⁵⁾. Thus, ectopic lipid accumulation appears to correlate with insulin resistance^(36; 37), but the lipid classes that mediate insulin resistance are unknown⁽³⁸⁾. We did not evaluate inflammatory markers in adipose tissue, but we demonstrated increased adipose tissue mass and liver lipid accumulation in HFD-O mice. Furthermore, it is important to point out that although HFD can impair the effect of insulin on glucose production, insulin-stimulated lipid synthesis was not altered in our study, indicating selective insulin resistance⁽³⁹⁾. Thus, damage to hepatic glucose homeostasis can occur in offspring of HFD dams in the absence of changes in lipid synthesis. Interestingly, in a previous study employing the same model as used here, we demonstrated that HFD-O mice (d82) exhibited liver insulin resistance and JNK and IKK activation in association with elevated TG content and reduced phosphorylation of AKT and acetyl-CoA carboxylase, limiting steps of de novo lipid synthesis⁽⁶⁾. Similarly, as shown here, HFD-O mice (d28) exhibited insulin resistance and

alterations in glucose homeostasis, although ACC phosphorylation was similar in HFD-O and SC-O mice. Furthermore, although hepatic TG and serum lipids were increased in abundance in HFD-O mice, the expression of enzymes involved in fatty acid biosynthesis (ACC and FAS) was not affected by maternal HFD consumption. However, HFD-O mice highly expressed SCD1, which converts stearate (C18:0) to oleate (C18:1) and palmitate (C16:0) to palmitoleate (C16:1). Previous studies showed that inhibition of SCD1 expression by SCD1-specific antisense oligonucleotides reduced blood insulin levels, *de novo* fatty acid synthesis, steatosis and expression of lipogenic genes, and increased fatty acid oxidization in primary mouse hepatocytes and the expression of genes promoting energy expenditure in liver and adipose tissues^(40; 41). Recently, animal studies indicating a relationship between SCD1 expression and metabolic disorders have been reported⁽⁴²⁾.

Increased *de novo* fatty acid synthesis (lipogenesis) and decreased beta-oxidation can lead to hepatic steatosis^(12; 13). As evidence, investigators have shown that maternal consumption of HFD affects total cholesterol and LDL-C levels and brain fatty acid composition^(5; 43). In support of the literature, HFD-O mice had more serum cholesterol, free fatty acids and TGs than SC-O mice. It is important to point out that maternal HFD consumption during lactation can contribute to milk composition^(44; 45) and therefore suckling periods could affect serum lipid levels. Although HFD-O mice received SC for 1 week after weaning, the impact of milk composition on the serum lipid profile cannot be overlooked. In physiological conditions, potential sources of fatty acids that contribute to liver TG deposition include hydrolysis in adipose tissue, dietary uptake and *de novo* lipogenesis in liver.

Studies in human and rodents have shown that excessive accumulation of liver TG mainly results from the overflow of fatty acids generated by lipolysis in insulin-resistant adipose tissue^(46; 47). Donnelly et al. showed that steatosis arose from circulating fatty acids in 60% of patients and from *de novo* lipogenesis in 25% of patients⁽⁴⁸⁾. In agreement with the literature, our results show that HFD-O mice have more adipose tissue and serum-free fatty acids than SC-O mice. Furthermore, maternal consumption of HFD-O affected SCD1 (increased expression) and genes related to fatty acid oxidation (reduced expression of ACADVL and CPT1) but did not affect enzymes important for fatty acid synthesis.

Altogether, these results suggest that hepatic TG accumulation in HFD-O mice can also be due to diminished fatty oxidation. Moreover, the high SCD1 enzyme activity could lead to increased availability of monounsaturated fatty acids for TG synthesis in HFD-O mice.

Many studies have indicated the importance of miRNA in lipid metabolism and liver physiology and disease ^(49; 50; 19; 51; 52; 53), but the role of these small non-coding RNAs in liver lipid metabolism is still controversial. Esau et al. showed that inhibition of miRNA-122 expression reduced fatty acid synthesis and increased fatty acid oxidation ⁽⁴⁹⁾. Recently, two studies employing genetic deletion in mice provide substantial evidence of miR-122 function in lipid metabolism ^(54; 55). Hsu et al. showed upregulation of genes involved in lipid synthesis in miR-deficient liver such as acylglycerolphosphate acyltransferase (*Agpat*), phosphatidic acid phosphatase type 2A (*Ppap2a*) and monoacylglycerol transferases (*Mogat*). Consistent with the gene expression changes, mutant liver synthesized more, but secreted less, TG than control liver, resulting in TG accumulation in mutant hepatocytes. In addition, both groups also showed an increase in the number of infiltrating inflammatory cells in liver of miRNA-122-deficient mice ^(54; 55), suggesting a proinflammatory effect of reduced expression of this miRNA. Interestingly, HFD-O mice exhibited reduced expression of miRNA-122, increased liver TG deposition and JNK activation, although SCD1 increased in expression. Others have shown that suppression of miRNA-122 in non-human primates reduces plasma cholesterol ^(56; 57). In our study, HFD-O mice expressed less HMGCR than SC-O mice, but the level of plasma cholesterol were increased rather than reduced. It is possible that maternal consumption of HFD modifies milk composition and affects the cholesterol level in plasma. We also found that HFD-O mice expressed more liver miRNA-370 than SC-O mice. This miRNA controls the expression of miRNA-122 and affects lipid metabolism ⁽¹⁹⁾. miR-370 upregulate the expression of miR-122, and miR-370 activates lipogenic genes indirectly through miR-122. Importantly, miR-370 directly downregulates CPT1 α , which controls the rate-limiting step in fatty acid β oxidation. In agreement with the literature, HFD-O mice also had reduced expression of CPT1 α and possibly reduced fatty acid β oxidation, as indicated by the diminished level of ACADVL protein and mRNA.

Thus, liver lipid accumulation in offspring of obese dams has multifactorial characteristics, and changes in the oxidative pathway are associated with differential expression of miR-370 and miR-122 in liver. In addition, HFD-O mice have also increased liver inflammation. This adaptive response leads to hepatic metabolic changes that cause liver injury.

Acknowledgements

The study was supported by grant #2011/22156-7, São Paulo Research Foundation (FAPESP) and grant #479017/2011-5, National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). No funding source had direct influence over the design, conduct or reporting of the present study.

R.O.B. is supported by grant #2011/13947-0, São Paulo Research Foundation (FAPESP) Fellow Masters in nutrition science, sport and metabolism. R.O.B. contributed to the development of the study hypothesis, reviewed the literature, conducted the statistical analysis, provided interpretation of results, and drafted and edited the manuscript. A.M.M. and F.O.B. contributed to the development of the study hypothesis and provided advice regarding interpretation of the results. L.M.I.S., M.M. and L.A.V. assisted with drafting and editing of the manuscript. M.A.T. provided advice regarding interpretation of the results and edited the manuscript. A.S.T. was responsible for the study design, data collection, provided advice regarding interpretation of the results and edited the manuscript.

The contributing authors report no conflict of interest.

References

1. Danielzik S, Langnase K, Mast M *et al.* (2002) Impact of parental BMI on the manifestation of overweight 5-7 year old children. *Eur J Nutr* **41**, 132-138.

2. Boney CM, Verma A, Tucker R *et al.* (2005) Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* **115**, e290-296.
3. Catalano PM, Farrell K, Thomas A *et al.* (2009) Perinatal risk factors for childhood obesity and metabolic dysregulation. *Am J Clin Nutr* **90**, 1303-1313.
4. Challier JC, Basu S, Bintein T *et al.* (2008) Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta* **29**, 274-281.
5. Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D *et al.* (2009) Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr* **102**, 514-519.
6. Ashino NG, Saito KN, Souza FD *et al.* (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.
7. Shankar K, Zhong Y, Kang P *et al.* (2011) Maternal obesity promotes a proinflammatory signature in rat uterus and blastocyst. *Endocrinology* **152**, 4158-4170.
8. Qureshi K & Abrams GA (2007) Metabolic liver disease of obesity and role of adipose tissue in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* **13**, 3540-3553.
9. Stanton MC, Chen SC, Jackson JV *et al.* (2011) Inflammatory Signals shift from adipose to liver during high fat feeding and influence the development of steatohepatitis in mice. *J Inflamm (Lond)* **8**, 8.
10. McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM *et al.* (2009) Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest* **119**, 323-335.
11. Heerwagen MJ, Stewart MS, de la Houssaye BA *et al.* (2013) Transgenic increase in N-3/n-6 Fatty Acid ratio reduces maternal obesity-associated inflammation and limits adverse developmental programming in mice. *PLoS One* **8**, e67791.

12. Postic C & Girard J (2008) The role of the lipogenic pathway in the development of hepatic steatosis. *Diabetes Metab* **34**, 643-648.
13. Bouanane S, Merzouk H, Benkalfat NB *et al.* (2010) Hepatic and very low-density lipoprotein fatty acids in obese offspring of overfed dams. *Metabolism* **59**, 1701-1709.
14. Waterland RA (2005) Does nutrition during infancy and early childhood contribute to later obesity via metabolic imprinting of epigenetic gene regulatory mechanisms? *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program* **56**, 157-171; discussion 171-154.
15. Sullivan EL & Grove KL (2010) Metabolic imprinting in obesity. *Forum Nutr* **63**, 186-194.
16. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281-297.
17. Li ZY, Xi Y, Zhu WN *et al.* (2011) Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4alpha. *J Hepatol* **55**, 602-611.
18. Yang YM, Seo SY, Kim TH *et al.* (2012) Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid. *Hepatology* **56**, 2209-2220.
19. Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y *et al.* (2010) MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J Lipid Res* **51**, 1513-1523.
20. 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.
21. Newberry EP, Xie Y, Kennedy S *et al.* (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.
22. Bonora E, Zavaroni I, Alpi O *et al.* (1987) Relationship between blood pressure and plasma insulin in non-obese and obese non-diabetic subjects. *Diabetologia* **30**, 719-723.

23. Stenseth NC, Viljugrein H, Saitoh T *et al.* (2003) Seasonality, density dependence, and population cycles in Hokkaido voles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11478-11483.
24. 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.
25. Cnop M (2008) Fatty acids and glucolipotoxicity in the pathogenesis of Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* **36**, 348-352.
26. Araujo EP, Torsoni MA & Velloso LA (2010) Hypothalamic inflammation and obesity. *Vitam Horm* **82**, 129-143.
27. Donath MY & Shoelson SE (2011) Type 2 diabetes as an inflammatory disease. *Nat Rev Immunol* **11**, 98-107.
28. Gregor MF & Hotamisligil GS (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**, 415-445.
29. Horng T & Hotamisligil GS (2011) Linking the inflammasome to obesity-related disease. *Nat Med* **17**, 164-165.
30. Velloso LA & Schwartz MW (2011) Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. *Int J Obes (Lond)* **35**, 1455-1465.
31. Levin BE (2010) Interaction of perinatal and pre-pubertal factors with genetic predisposition in the development of neural pathways involved in the regulation of energy homeostasis. *Brain Res* **1350**, 10-17.
32. Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB *et al.* (2007) Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. *J Endocrinol* **194**, 539-550.
33. Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP *et al.* (2008) Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol* **48**, 628-637.

34. Wiedemann MS, Wueest S, Item F *et al.* (2013) Adipose tissue inflammation contributes to short-term HFD-induced hepatic insulin resistance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **305**, E388-395.
35. Turner N, Kowalski GM, Leslie SJ *et al.* (2013) Distinct patterns of tissue-specific lipid accumulation during the induction of insulin resistance in mice by high-fat feeding. *Diabetologia* **56**, 1638-1648.
36. Kraegen EW & Cooney GJ (2008) Free fatty acids and skeletal muscle insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* **19**, 235-241.
37. Samuel VT & Shulman GI (2012) Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* **148**, 852-871.
38. Farese RV, Jr., Zechner R, Newgard CB *et al.* (2012) The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metab* **15**, 570-573.
39. Brown MS & Goldstein JL (2008) Selective versus total insulin resistance: a pathogenic paradox. *Cell Metab* **7**, 95-96.
40. Jiang G, Li Z, Liu F *et al.* (2005) Prevention of obesity in mice by antisense oligonucleotide inhibitors of stearoyl-CoA desaturase-1. *J Clin Invest* **115**, 1030-1038.
41. Yokoyama S, Hosoi T & Ozawa K (2012) Stearoyl-CoA Desaturase 1 (SCD1) is a key factor mediating diabetes in MyD88-deficient mice. *Gene* **497**, 340-343.
42. Hodson L & Fielding BA (2013) Stearoyl-CoA desaturase: rogue or innocent bystander? *Prog Lipid Res* **52**, 15-42.
43. Yu H, Bi Y, Ma W *et al.* (2010) Long-term effects of high lipid and high energy diet on serum lipid, brain fatty acid composition, and memory and learning ability in mice. *Int J Dev Neurosci* **28**, 271-276.

44. Silber GH, Hachey DL, Schanler RJ *et al.* (1988) Manipulation of maternal diet to alter fatty acid composition of human milk intended for premature infants. *Am J Clin Nutr* **47**, 810-814.
45. Priego T, Sanchez J, Garcia AP *et al.* (2013) Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. *Lipids* **48**, 481-495.
46. Lewis GF, Carpentier A, Adeli K *et al.* (2002) Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* **23**, 201-229.
47. Ferre P & Fofelle F (2010) Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c. *Diabetes Obes Metab* **12 Suppl 2**, 83-92.
48. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ *et al.* (2005) Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest* **115**, 1343-1351.
49. Esau C, Davis S, Murray SF *et al.* (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab* **3**, 87-98.
50. Li S, Chen X, Zhang H *et al.* (2009) Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res* **50**, 1756-1765.
51. Whittaker R, Loy PA, Sisman E *et al.* (2010) Identification of MicroRNAs that control lipid droplet formation and growth in hepatocytes via high-content screening. *J Biomol Screen* **15**, 798-805.
52. Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC *et al.* (2011) Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis. *J Clin Invest* **121**, 2921-2931.
53. Aranda JF, Madrigal-Matute J, Rotllan N *et al.* (2013) MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases. *Free Radic Biol Med* **(Epublication ahead of print version)**.

54. Hsu SH, Wang B, Kota J *et al.* (2012) Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest* **122**, 2871-2883.
55. Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS *et al.* (2012) MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest* **122**, 2884-2897.
56. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R *et al.* (2005) Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* **438**, 685-689.
57. Elmen J, Lindow M, Schutz S *et al.* (2008) LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* **452**, 896-899.

DISCUSSÃO

É de conhecimento que a obesidade vem crescendo de maneira alarmante no mundo todo e representa um dos maiores problemas de saúde pública. Este distúrbio metabólico não distingue raça, sexo, idade e nível social. Fatores como estilo de vida, dieta e genética contribuem para o desenvolvimento dessa doença (Raman, 2002; Stein, 2004; Pausova, 2006).

Nos últimos anos pesquisadores vêm discutindo cada vez mais sobre a relação entre o meio intrauterino adverso e o desenvolvimento de doenças na vida adulta. Este fenômeno denominado “programação fetal” é descrito como um processo no qual o estímulo ocorre “in útero”, e o mesmo estabelece uma resposta permanente no feto, conduzindo a um aumento da susceptibilidade a doenças na vida adulta. Além disso, os períodos iniciais do desenvolvimento pós-natal, podem também causar alterações metabólicas (Armitage, 2005).

Estudos mostram que a exposição do feto a um ambiente nutricional adverso (dietas hipercalóricas, hiperlipídicas, hipoproteicas e etc.) durante o desenvolvimento e o período pós-natal podem ter consequências importantes para o desenvolvimento do sistema regulatório do metabolismo energético (Vickers et al., 2000).

Os efeitos sobre a prole podem ser decorrentes tanto de alterações apresentadas pela mãe durante a gestação, como também durante a amamentação. Em um estudo realizado por Shankar et al. (2008), o efeito da gestação foi isolado através do modelo de *cross-fostering* (troca de mães na lactação) e, mesmo neste modelo, o consumo materno de dieta rica em gordura ocasionou maior adipogênese na prole.

Em outro estudo isolando-se o fator lactação, foi demonstrado que o aleitamento por ratas diabéticas provocou na prole defeitos no balanço de neuropeptídeos orexigênicos e anorexigênicos do hipotálamo, levando à hiperfagia e ganho de peso (Fahrenkrog et al., 2003).

Em trabalho recente do nosso grupo (Ashino et al., 2012) foi observado que a prole de mães submetidas à uma dieta hipercalórica durante a gestação e lactação, apresentou aumento de peso com dois dias de vida e esse aumento também foi visto quando a prole atingiu a idade adulta (82 dias). Além disso, os animais filhos de mães que receberam dieta hipercalórica apresentaram um aumento no peso do tecido adiposo epididimal com 28 dias e na fase adulta com 82 dias.

Em outro estudo Samuelsson e colaboradores (2008) observaram que a prole de mães que receberam uma dieta hiperglicídica e hiperlipídica apresentou um aumento na ingestão calórica e no peso corporal.

Assim, tem sido proposto que o risco de desenvolver desordens metabólicas na vida adulta é iniciado nos períodos do desenvolvimento.

O presente estudo avaliou prole de camundongos com 28 dias (HFD-O), cujas mães receberam dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação, quanto à composição corporal, parâmetros metabólicos e modulação da expressão gênica e protéica que pudessem prover informações sobre o metabolismo lipídico hepático nesses animais.

Assim como observado na literatura (Fahrenkrog et al., 2003; Shankar et al., 2008; Samuelsson et al., 2008; Ashino et al., 2012), nossos dados mostram que uma dieta rica em gordura durante a gestação e lactação predispõe a um maior ganho de peso e maior acúmulo de massa de tecido adiposo. No presente estudo, os animais do grupo HFD-O tiveram um aumento do peso corpóreo absoluto com 7 dias de vida, que permaneceu até os 28 dias de vida (Tabela II) em relação ao grupo SC-O (prole de camundongos com 28 dias, cujas mães receberam dieta controle (ração) durante a gestação e lactação. Concomitante ao aumento de peso, observou-se um aumento da massa de tecido adiposo branco epididimal e retroperitoneal (Tabela II) do grupo HFD-O quando comparado ao grupo SC-O.

A resistência à insulina é caracterizada pela diminuição da capacidade deste hormônio de promover a captação da glicose. A resposta subnormal dos tecidos periféricos leva a célula β da ilhota pancreática a sintetizar e secretar mais insulina, levando à hiperinsulinemia. A manutenção deste quadro acarreta na falência da célula β , caracterizando o Diabetes Mellitus tipo II (DM 2) (Collins et al., 2000).

Estudos mostram que as proles de ratas que receberam dieta hiperlipídica durante a gestação apresentaram-se hiperglicêmicas e hiperinsulinêmicas, e que a exposição ao alto teor de gordura durante a gestação e lactação compromete o desenvolvimento e a função das células β em ratos neonatos e recém-desmamados (Cerf et al., 2009).

Utilizando-se de um modelo de Cross-fostering (troca de mães na lactação), porém valendo-se de subnutrição pré-natal e super-nutrição pós-natal, Desai (2007) mostrou diferenças na composição corpórea, glicemia e lipidemia na prole.

Outros estudos também mostraram que a prole de mães diabéticas ou que receberam uma dieta hiperlipídica, apresentavam excesso de glicose circulante, resistência à insulina e hiperinsulinemia (Van Assche et al., 1985; Plagemann et al. 1999^a; Buckley et al., 2005).

A fim de verificar se a prole HFD-O apresenta distúrbios do metabolismo da glicose foram determinados o comportamento da glicemia após sobrecarga de glicose (GTT) (Tabela II) e após sobrecarga de insulina (ITT) (Tabela III).

Foi possível observar que os animais da prole HFD-O são intolerantes à glicose e resistentes à ação da insulina. Além disso, os animais HFD-O exibem níveis elevados de p-IKK e p-JNK (Figuras 2 A e B, respectivamente) em comparação com animais SC-O, sugerindo que a resistência à insulina hepática poderia estar associada à ativação de vias pró-inflamatórias (Barbuio et al, 2007;. Cintra et al, 2008;. Donath e Shoelson 2011).

Estudos relatam que uma dieta rica em lipídeos saturados aumenta o triacilglicerol sérico (TAG), o colesterol total e alteram o perfil lipídico. Um estudo recente mostrou que a prole de ratas que foram alimentadas com uma dieta hiperlipídica e hiperglicídica apresentaram aumento nos níveis de triglicérides e glicogênio hepáticos, assim como uma diminuição nos genes envolvidos com a oxidação de lipídeos (Kjaergaard et al., 2013).

Em um trabalho do nosso grupo (Ashino et al. 2012) as proles de mães que ingeriram dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação na vida adulta apresentaram uma diminuição dos níveis de triglicérides séricos, aumento nos valores de triglicérides hepáticos e a presença de vacúolos de gordura caracterizando a DHGNA. Esse estudo mostrou também que nessa prole há uma maior mobilização de gordura no tecido adiposo e

um maior nível de ácidos graxos livres no soro em relação ao grupo controle, indicando que o fluxo de ácidos graxos para o fígado está aumentado nesses animais.

O estudo conduzido por Krasnow (2011), avaliando a prole de mães que receberam dieta hiperlipídica ou mães que tiveram a dieta revertida na segunda ou terceira gestação, também mostrou que a prole de mães obesas da primeira gestação apresentou aumento nos triglicérides hepático em relação à prole controle.

Nossos resultados corroboram dados da literatura e mostram que o efeito da dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação acarreta danos no perfil lipídico da prole já com 28 dias. Os animais HFD-O apresentaram aumento nos níveis de triglicérides, colesterol e ácidos graxos séricos (Tabela III), assim como aumento na concentração de triglicérides hepáticos (Tabela III).

Em conjunto, nossos resultados apontam para uma forte relação entre o consumo de dieta hiperlipídica e o desenvolvimento de esteatose hepática.

O desenvolvimento de resistência hepática à insulina parece ser um requerimento essencial para o desenvolvimento de DHGNA. A resistência contribui para o quadro de DHGNA por alterar a síntese e o transporte de triglicérides, aumentando a lipólise no tecido adiposo e o transporte de ácidos graxos livres para o fígado (Bugianesi, McCullough, Marchesini, 2005; Fabbrini, Sullivan, Klein, 2010). A reesterificação desses ácidos graxos contribui significativamente para o acúmulo hepático de triglicérides na DHGNA (Donnelly et al., 2005) e, nessas condições, a quantidade de enzimas da via de biossíntese de ácidos graxos pode estar aumentada.

Após caracterizar os animais em relação ao peso, adiposidade, tolerância à glicose, resistência à insulina e o perfil lipídico, fomos verificar a expressão gênica e proteica de genes que estão relacionados com a síntese de ácidos graxos e colesterol, e genes envolvidos com a oxidação de ácidos graxos.

Inicialmente foi avaliado se a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação apresentava alterações nas proteínas das vias de síntese de ácidos graxos e triacilgliceróis e na quantidade de transcritos (RNAm) dos genes envolvidos

nessas vias. Para tanto, foram verificadas a fosforilação da ACC e a expressão de SCD1 e FAS no fígado de animais dos grupos SC-O e HFD-O, aos 28 dias de vida, pela técnica de western blot, assim como a expressão dos genes responsáveis pela codificação das duas proteínas, pela técnica de RT-PCR.

Nossos resultados mostram que a fosforilação da ACC e a expressão desse gene não foi diferente entre os grupos SC-O e HFD-O (Figura 3 A e E). Diferentemente da ACC as análises realizadas por Western Blotting mostraram que a proteína SCD1 estava aumentada no grupo HFD-O (2,2 vezes) em relação ao grupo SC-O (Figura 3 B), assim como a expressão gênica, analisada por RT-PCR (Figura 3 E).

Os resultados de Western Blot e RT-PCR para FAS mostraram que houve uma tendência de aumento na quantidade proteica e uma tendência a diminuição no nível de RNAm desse gene na prole HFD-O. No entanto a diferença para o grupo SC-O não foi significativa (Figura 3 C e E).

A síntese de ácido graxo e triacilglicerol no fígado e tecido adiposo são fatores primordiais para o acúmulo de gordura. Os triacilgliceróis estocados no tecido adiposo são compostos de ácidos graxos provenientes da dieta e da síntese hepática “de novo”.

O tecido adiposo é o responsável por manter o balanço energético através da homeostase lipídica. Alterações nesse balanço, como ocorrem na obesidade, podem levar a um aumento no estoque de gordura. Em humanos obesos e em modelos de obesidade animal, a enzima SCD1 encontra-se ativada, levando a um aumento na razão de ácidos graxos monoinsaturados/saturados (Hulver et al., 2005).

Ácidos graxos monoinsaturados, como palmitoleato e oleato, são substratos preferenciais para a síntese de triacilgliceróis. Dessa forma, um aumento na razão de monoinsaturados/saturados, aumenta a propensão ao armazenamento de gordura, sendo, portanto, a atividade da SCD1 um marcador da lipogênese.

Nossos resultados mostram que o consumo de dieta rica em gordura pela mãe, levou a uma maior ativação da SCD1, fato que pode indicar um aumento do processo de lipogênese. Yee e colaboradores (2011) mostraram que um aumento no índice de dessaturação

oleato/estearato no tecido adiposo de prole de mães com restrição alimentar, pode ser observado antes mesmo desses indivíduos desenvolverem o fenótipo obeso, corroborando nossos dados.

Os resultados encontrados para FAS são condizentes com os resultados encontrados para ACC, uma vez que, como a ACC encontra-se inalterada nos animais do grupo HFD-O, o suprimento de malonil-CoA também não se altera. Sem a produção de malonil-CoA no citoplasma, a célula não inicia a síntese de ácidos graxos, catalisada pela FAS. No entanto, o fato da síntese de ácido graxo permanecer inalterada nos animais do grupo HFD-O não representa que a síntese de triacilgliceróis também esteja normalizada. Como os triacilgliceróis podem ser produzidos à partir da reesterificação dos ácidos graxos mobilizados do tecido adiposo (lipólise), o maior conteúdo de triacilgliceróis encontrado no grupo HFD-O poderia ser proveniente dessa via.

Adicionalmente fomos verificar o gene da Glicerol-3-fosfato aciltransferase (GPAT), enzima que desempenha um papel central na regulação do triacilglicerol celular e nos níveis de fosfolípidos (Welch et al., 1998). Vimos que não houve diferença entre os grupos SC-O e HFD-O (Figura 3 E). Era de se esperar que a expressão da GPAT mitocondrial estivesse alterada, uma vez que foi observado aumento pronunciado de SCD1, indicativo de síntese de triglicérides. O resultado obtido, apesar de curioso, sugere que, muito provavelmente, apesar de haver substrato disponível para a síntese ocorrer, o evento deva ser um pouco mais tardio, como observado pelo nosso grupo em trabalho anterior conduzido com a prole aos 82 dias de vida (Ashino et al., 2012).

Para avaliar se a prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica, durante a gestação e a lactação, apresentava alteração na síntese de colesterol, a expressão hepática da HMG-CoA redutase (HMGCR) foi avaliada nos grupos SC-O e HFD-O aos 28 dias de vida, tanto por Western Blot, quanto por RT-PCR. Diferente do esperado, a prole cuja mãe recebeu dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação apresentou menor expressão de HMGCR em relação à prole controle, sem que se observasse diferença na quantidade proteica (Figura 3 D e E).

De posse dos resultados obtidos de expressão de genes e ativação de proteínas envolvidas com o processo de lipogênese, o passo seguinte foi analisar possíveis alterações no comportamento de proteínas envolvidas com o processo de oxidação de ácidos graxos.

A primeira enzima avaliada foi a AMPK. A enzima AMPK é uma serina-quinase, envolvida com a ativação de vias catabólicas, dentre elas a beta-oxidação, e é responsável por modular negativamente a ACC, tornando esta proteína fosforilada e, conseqüentemente, inativa. Nossos resultados mostraram que não há diferença na fosforilação da AMPK (Figura 4A), porém, em contrapartida, observamos que a expressão gênica da AMPK analisada por RT-PCR está aumentada (Figura 4C).

Após avaliar a expressão da AMPK, enzima que, quando ativa, estimula a beta-oxidação, fomos avaliar uma importante enzima dessa via e outra enzima fundamental para o transporte de ácidos graxos para a mitocôndria, servindo como um marcador de oxidação dos mesmos. Analisamos a expressão gênica da ACADVL e CPT-1 e verificamos que as mesmas estão diminuídas na prole HFD-O em relação à prole SC-O (Figura 4C). Concomitante à expressão gênica vimos que a quantidade proteica da ACADVL também está diminuída na prole HFD-O (Figura 4B).

Como dito anteriormente, em condições fisiológicas as potenciais fontes de ácidos graxos, que contribuem para o depósito de triglicérides no fígado, são os ácidos graxos obtidos a partir da hidrólise (mobilização) no tecido adiposo, os ácidos graxos captados à partir da dieta e os ácidos graxos obtidos pela síntese “de novo” no fígado. Estudos em humanos e roedores mostraram que o acúmulo excessivo de triglicérides no fígado ocorre principalmente pelo excesso de ácidos graxos provenientes da lipólise no tecido adiposo (Ferre e Foufelle 2010; Lewis et al., 2002). Donnelly e seus colegas mostraram que, em pacientes com esteatose, aproximadamente 60% dos distúrbios são causados pelos ácidos graxos circulantes e 25% pela lipogênese “de novo” (Donnelly et al., 2005). Corroborando os dados da literatura, nossos resultados mostram que os animais HFD-O apresentaram maior massa de tecido adiposo e de ácidos graxos livres no soro do que SC-O. Além disso, as enzimas importantes para a síntese de ácidos graxos não foram influenciados pelo consumo materno da dieta hiperlipídica, mas os animais HFD-O apresentaram redução na expressão de genes importantes que dizem respeito à oxidação de ácidos graxos (ACADVL

e CPT-1) e o aumento da expressão da enzima SCD1. No total, estes resultados sugerem que o acúmulo de triglicérides hepáticos na prole HFD-O podem ser devido à oxidação de ácidos graxos diminuída.

Finalmente fomos avaliar a expressão gênica de dois miRNAs muito importantes para o metabolismo de lipídeos. O miR-122, um miRNA que foi um dos primeiros apontados como regulador dos níveis de lipídios circulantes em indivíduos obesos e com esteatose hepática (Drosatos et al., 2007) e o miR-370, possível ativador de miR-122, que é um miRNA que possui como alvo o gene da CPT1 α e atua diminuindo a expressão desse gene, consequentemente diminuindo a beta-oxidação (Moore et al., 2010; Iliopoulos et al., 2010).

Nossos resultados mostram que o consumo materno de dieta hiperlipídica durante todo o período de gestação e lactação leva a uma diminuição da expressão de miR-122 e um aumento na expressão de miR-370 (Figura 5C e D) na prole jovem, com 28 dias de vida. Zhang e colaboradores (2009) também mostraram que o uso de dieta hiperlipídica em animais induziu diminuição na expressão do microRNA miR-122 e Iliopoulos e colaboradores (2010) mostraram que o miR-370 regula o miR-122, corroborando nossos achados.

Segundo Drosatos e colaboradores (2007), miR-122 modula a expressão de genes lipogênicos, ativando inicialmente SREBP-1c e DGAT2 e, subsequentemente, FAS e ACC1.

Além de analisar a expressão do miR-122 fomos verificar a expressão gênica e quantidade proteica do fator de transcrição HNF4- α , o qual induz a transcrição do pri-miRNA do miR-122 (Zhen-Ya et al., 2011), e observamos que não houve diferença entre os grupos SC-O e HFD-O na expressão gênica e na quantidade proteica (Figura 5 A e B).

Muitos estudos apontam a importância dos miRNAs no metabolismo lipídico e fisiologia do fígado e doenças (Aranda et al, 2013; Esau et al., 2006; Iliopoulos et al., 2010; Li et al., 2009; Rayner et al., 2011; Whittaker et al., 2010), mas o papel destes pequenos RNAs não-codificantes no metabolismo lipídico no fígado ainda é controversa. Esau et al. mostraram que a inibição da expressão de miRNA-122 levou a uma diminuição na síntese dos ácidos graxos e aumento da oxidação dos mesmos (Esau et al., 2006). Recentemente, dois estudos

com deleção genética em camundongos apresentaram provas substanciais da função do miR-122 no metabolismo lipídico (Hsu et al, 2012;Tsai et al., 2012). Hsu e colaboradores (2012) mostraram a regulação positiva de genes conhecidos por estarem envolvidos na síntese de lipídios no fígado, como acilglicerolfosfatase aciltransferase (AGPAT), proteína fosfatase ácida tipo 2A (Ppap2a) e monoacilglicerol O-aciltransferase (Mogat). De acordo com as mudanças na expressão gênica, o fígado mutante sintetiza mais triglicérides que os controles, mas secreta menos, resultando em acúmulo de triglicérides nos hepatócitos. Além disso, ambos os grupos mostraram um aumento na infiltração de células inflamatórias no fígado desses camundongos deficientes em miRNA-122 (Hsu et al., 2012; Tsai et al., 2012), sugerindo um efeito pró-inflamatório quando a expressão deste miRNA está reduzida. Curiosamente, os camundongos HFD-O apresentaram redução na expressão de miRNA-122, aumento do depósito de triglicérides no fígado e ativação de JNK, mas apenas SCD1 teve sua expressão aumentada. Por outro lado, o antagonismo de miRNA-122 em macacos reduz o colesterol no plasma (Elmen et al., 2008;Krützfeldt et al., 2005).

Assim, o acúmulo de lipídios no fígado de mães obesas HFD-O tem caráter multifatorial, mas as mudanças na via oxidativa podem ser associadas à expressão diferencial de miR-370 e miR-122 no fígado. Além disso, as proles apresentaram também um aumento na inflamação do fígado. Esta resposta adaptativa leva a alterações metabólicas que causam lesão hepática.

Estes resultados reforçam a importância da nutrição materna durante as fases iniciais do desenvolvimento e sugerem que o consumo de dieta rica em gordura pela mãe predispõe a prole ao desenvolvimento de um fenótipo obeso na vida adulta, independente da dieta oferecida após o desmame.

CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstram que o acúmulo de lipídios no fígado da prole de mães obesas que consumiram dieta hiperlipídica, durante os períodos de gestação e lactação, tem características multifatoriais, sendo uma delas o aumento da inflamação no órgão. As alterações observadas na oxidação de ácidos graxos estão relacionadas com a expressão diferencial de miR-370 e miR-122 no fígado da prole. Tais alterações metabólicas hepáticas podem ser decorrentes de uma resposta adaptativa que culmina com o desenvolvimento de lesões e disfunções no órgão na vida adulta.

REFERÊNCIAS

Albuquerque KT, Sardinha FLC, Telles MM, Watanabe RLH, Nascimento CMO, Carmo MGT, Ribeiro EB (2006). “Intake of trans fatty acid–rich hydrogenated fat during pregnancy and lactation inhibits the hypophagic effect of central insulin in the adult offspring”. Nutrition **22**:820-829.

Aranda JF, Madrigal-Matute J, Rotllan N & Fernandez-Hernando C (2013). “MicroRNA modulation of lipid metabolism and oxidative stress in cardiometabolic diseases”. Free Radic Biol Med **13**:345-346.

Armitage JA, Poston L, Taylor PD (2008). “Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity”. Front Horm Res **36**:73–84.

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 Apr **23**(4):341-8.

Bao N, Lye KW, Barton MK (2004). “MicroRNA binding sites in Arabidopsis class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome”. Dev Cell **7**:653–662.

Barbuio R, Milanski M, Bertolo MB, Saad MJ & Velloso LA (2007). Influximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high-fat diet. J Endocrinol **194**:539-550.

Bartel DP (2004). “MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function”. Cell **116**:281-297.

Bayol SA, Simbi BH, Fowkes RC, Stickland NC (2010). “A Maternal "Junk Food" Diet in Pregnancy and Lactation Promotes Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Rat Offspring”. Endocrinology **151**:1451-146.

Beutler B, Jiang Z, Georgel P, Crozat K, Croker B, Rutschmann S, Du X, Hoebe K (2006). “Genetic analysis of host resistance: Toll-like receptor signaling and immunity at large”. Annu Rev Immunol **24**:353-89.

Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J (2004). “Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects”. Mol Aspects Med **25**:495–520.

Buckley AJ, Keseru B, Briodyc J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CE (2005). “Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat-fed rats”. Metabolism clinical and experimental **54**:500-507.

Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G (2005). “Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease”. Hepatology **42**(5):987-1000

Burns DM, D'Ambrogio A, Nottrott S, Richter JD (2011). "CPEB and two poly (A) polymerases control miR-122 stability and p53 mRNA translation". Nature **473**:105-108.

Cannell IG, Kong YW, Bushell M (2008). "How do microRNAs regulate gene expression?" Biochem Soc Trans **36**(Pt 6):1224-31.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ (2012). "The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice Guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association". Hepatology **55**(6):2005-23.

Challier JC, Basu S, Bintein T, Minium J, Hotmire K, Catalano PM, Mouzon SH (2008). "Obesity in Pregnancy Stimulates Macrophage Accumulation and Inflammation in the Placenta". Placenta **29**: 274- 281.

Cerf CS, Chapman CJ, Muller, Louw J (2009). "Gestational high-fat programming impairs insulin release and reduces Pdx-1 and glucokinase immunoreactivity in neonatal Wistar rats". Metabolism (12)1787:1792.

Cheung O, Puri P, Eicken C, Contos MJ, Mirshahi F, Maher JW, Kellum JM, Min H, Luketic VA, Sanyal AJ (2008). "Nonalcoholic steatohepatitis is associated with altered hepatic MicroRNA expression". Hepatology **48**(6):1810-20.

Cintra DE, Pauli JR, Araujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ & Velloso LA (2008). Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. J Hepatol **48**:628-637.

Collins T, Cotran RS, Kumar V (2000). “Patologia Estrutural e Funcional”. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 406-9.

Coutinho JG, Gentil PC, Toral N (2008). “A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição”. Cad. Saúde Pública, **24** (Sup 2):S332-S340.

Crozier SR, Inskip HM, Godfrey KM, Cooper C, Harvey NC, Cole ZA, Robinson SM (2010). “Weight gain in pregnancy and childhood body composition: findings from the Southampton Women’s Survey”. Am J Clin Nutr **91**(6):1745-51.

Desai M, Babu J, Ross MG (2007). “Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition”. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **293**(6):R2306-14.

Donath MY & Shoelson SE (2011) “Type 2 diabetes as an inflammatory disease”. Nat Rev Immunol **11**:98-107.

Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD & Parks EJ (2005). “Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease”. J Clin Invest **115**:1343-1351.

Drosatos K, Sanoudou D, Kypreos KE, Kardassis D, Zannis VI (2007).” A dominant negative form of the transcription factor c-Jun affects genes that have opposing effects on lipid homeostasis in mice”. J Biol Chem **282**(27):19556-64.

Duarte MASM, Silva, GAP (2010). Obesity in children and adolescents: the relation between metabolic syndrome and non-alcoholic fatty-liver disease. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant **10** (2):171-181.

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ (2005). “The metabolic syndrome”. The Lancet **365** (9468):1415–28.

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004). “Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy”. Nature **429**:457–463.

Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA (2009). “Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice”. British Journal of Nutrition **102**:514-519.

Elmen J, Lindow M, Schutz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjarn M, Hansen HF, Berger U, et al. (2008). “LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates”. Nature **452**:896-899.

El-Serag HB (2011). “Hepatocellular carcinoma”. N Engl J Med **365** (12):1118–1127.8.

Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP (2006). “miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting”. Cell Metab **3**(2):87-98.

Escoda MSQ (2002). “Para a crítica da transição nutricional”. Ciência & Saúde Coletiva **7**(2): 219-226.

Fabbrini E, Sullivan S, Klein S (2010).” **Obesity and nonalcoholic fatty liver disease: biochemical, metabolic, and clinical implications**”. Hepatology **51**(2):679-89.

Ferrante AW (2007). “Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation”. J Intern Med **262**(4):408-14.

Ferre P & Foufelle F (2010). “Hepatic steatosis: a role for de novo lipogenesis and the transcription factor SREBP-1c”. Diabetes Obes Metab **12 Suppl 2**:83-92.

Filipowicz W, Grosshans H. (2011). “The liver-specific microRNA miR-122: biology and therapeutic potential”. Prog Drug Res **67**:221–238.

Finkelstein EA, Khavjou OA, Thompson H, Trogon JG, Pan L, Sherry B, Dietz W (2012). “Obesity and severe obesity forecasts through 2030”. Am.J.Prev.Med **42**:563–570.

Flegal, KM, Margaret D, Carroll MSPH, Brian K, Ogden CL (2012). “Prevalence of Obesity and Trends in the Distribution of Body Mass Index Among US Adults, 1999-2010”. JAMA **307**(5):491-497.

Gallou-Kabani C, Junien C (2005). “Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. New perspective against the epidemic”. Diabetes **54**(7):1899-906.

Gigante DP, Barros FC, Cora LA, Olinto MTA (1997). “Prevalência de obesidade em adultos e seus fatores de risco”. Rev. Saúde Pública **31**(3): 236-246.

Gonzalez FJ (2008). “Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription”. Drug Metab Pharmacokinet. **23**(1):2-7

Guyton AC, Hall JE. “Tratado de Fisiologia Médica”. 12^a. Ed. Editora Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 2011.

Hall LF, Neubert AG (2005). “Obesity and pregnancy”. Obstet Gynecol Surv **60**(4):253.

Harder T, Franke K, Fahrenkrog S, Aerts L, Van Bree R, Van Assche FA, Plagemann A (2003). “**Prevention by maternal pancreatic islet transplantation of hypothalamic malformation in offspring of diabetic mother rats is already detectable at weaning**”. Neurosci Lett **3**:163-6

Hardie DG, Scott JW, Pan DA, Hudson ER (2003). “Management of cellular energy by the AMPactivated protein kinase system”. Febs Lett **546**:113-20.

Heslehurst N, Ells LJ, Simpson H, Batterham A, Wilkinson J (2007). “Trends in maternal obesity incidence rates, demographic predictors, and health inequalities in 36,821 women over a 15-year period”. Bjog **114**:187-194.

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

Hulver MW, Berggren JR, Carper MJ, Miyazaki M, Ntambi JM, Hoffman EP, Thyfault JP, Stevens R, Dohm GL, Houmard JA, Muoio DM (2005). “Elevated stearoyl-CoA desaturase-1 expression in skeletal muscle contributes to abnormal fatty acid partitioning in obese humans”. Cell Metab **2**(4):251-61.

Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR, et al. (2012). “Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver”. J Clin Invest **122**:2871-2883.

IASO - International Association for the Study of Obesity. Acesso em 28/05/13 [<http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/>]

Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis YI (2010). “MicroRNA- 370 controls the expression of MicroRNA-122 and Cpt1 α and affects lipid metabolism”. J. Lipid Res **51**:1513–1523.

James PT, Leach R, Kalamara E, Shayeghi M (2001). “The worldwide obesity epidemic”. Obes Res **9**(Suppl 4):S228-33.

Jones PA, Baylin SB (2002). “The fundamental role of epigenetic events in cancer”. Nat Rev Genet **3**:415–428.

Jopling CL (2012). “Liver Specific microRNA-122”. RNA Biology **9**(2)1–6.

Junior RMM, Fernandes VO (2009). “Obesidade e Disruptores Endócrinos”. Revista ABESO - Edição nº 42 - Ano VIX - Nº 42.

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003). “Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias”. Cell **115**(2):209-16.

King JC (2006). “Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes”. Annu Rev Nutr **26**:271-91.

Kjaergaard M, Nilsson C, Rosendal A, Nielsen MO, Raun K (2013). “Maternal chocolate and sucrose soft drink intake induces hepatic steatosis in rat offspring associated with altered lipid gene expression profile”. Acta Physiol (Oxf) 1748-1716.

Kopelman PG (2000). “Obesity as a medical problem”. Nature **404**(6778):635-43.

Krasnow SM, Nguyen ML, Marks DL (2011). "Increased maternal fat consumption during pregnancy alters body composition in neonatal mice". Am J Physiol Endocrinol Metab **301**(6):E1243-53.

Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M, Rajewsky N. (2005). "Combinatorial microRNA target predictions". Nat Genet **37**(5):495-500.

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. (2005). "Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs' ". Nature **438**:685-689.

Kusakabe T, Maeda M, Hoshi N, Sugino T, Wa-tanabe K, Fukuda T, Suzuki T (2000). "Fatty acid synthase is expressed mainly in adult hormonesensitive cells or cells with high lipid metabolism and in proliferating fetal cells". J Histochem Cytochem **48**:613-622.

Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, Jacob ST, Ghoshal K (2006). "Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas". J Cell Biochem **99**(3):671-678.

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, & Tuschl T (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse". Current Biology **12**:735-739.

Lanford RE, Hildebrandt-Eriksen ES, Petri A, Persson R, Lindow M, Munk ME, Kauppinen S, Orum H (2010). "Therapeutic silencing of microRNA- 122 primates with chronic hepatitis C virus infection". Science **327**(5962):198-201.

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*". Cell **75**:843-854.

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing". Nature **425**(6956):415-9.

Lee Y, Hur I, Park SY, Kim YK, Suh MR, Kim VN (2006). "The role of PACT in the RNA silencing pathway". Embo Journal **25**:522-532.

Lewis GF, Carpentier A, Adeli K & Giacca A (2002). "Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes". Endocr Rev **23**:201-229.

Li S, Chen X, Zhang H *et al.* (2009) Differential expression of microRNAs in mouse liver under aberrant energy metabolic status. *J Lipid Res* **50**, 1756-1765.

Li ZY, Xi Y, Zhu WN, Zeng C, Zhang ZQ, Guo ZC, Hao DL, Liu G, Feng L, Chen HZ, Chen F, Lv X, Liu DP, Liang CC (2011). "Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4 α ". J Hepatol. **55**(3):602-11

Lin Q, Gao Z, Alarcon RM, Ye J, Yun Z (2009) "A role of miR-27 in the regulation of adipogenesis". Febs j **276**:2348-2358.

Ludwig J, Viggiano TR, McGill DB (1980) “Nonalcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experience with an hitherto unnamed disease”. Mayo Clin Proc **55**:434–438.

Marinho, SP Martins IS, Perestrelo JPP, Oliveira DC (2003). “Obesidade em adultos de segmentos pauperizados da sociedade”. Rev. Nutr **16**(2):195-201.

McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Smith MS, Friedman JE (2009). “Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates”. J Clin Invest **119**(2):323-35.

Ministério da Saúde, (2011) VIGITEL BRASIL. Acesso em 28/05/13. [http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2012/Ago/22/vigitel_2011_final_0812.pdf]

Moore, KJ, Rayner KJ, Suárez Y, Fernández-Hernando C (2011). “The Role of MicroRNAs in Cholesterol Efflux and Hepatic Lipid Metabolism”. Annu. Rev. Nutr. **31**:6.1–6.15.

Nakanishi N, Nakagawa Y, Tokushige N, Aoki N, Matsuzaka T, Ishii K, Yahagi N, Kobayashi K, Yatoh S, Takahashi A, Suzuki H, Urayama O, Yamada N, Shimano H. (2009). “The up-regulation of microRNA-335 is associated with lipid metabolism in liver and white adipose tissue of genetically obese mice”. Biochem Biophys Res Commun **385**:492-496.

Nucci LB, Schmidt MI, Duncan BB, Fuchs SC, Fleck ET, Santos Britto MM (2001). “Nutritional status of pregnant women: prevalence and associated pregnancy outcomes”. Rev Saude Pública **35**(6):502-7.

Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews PJ, Morgan ML, Mckee C, Soeda J, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Ozanne SE, Sigala B, Novelli M, Poston L, Taylor PD (2010). “Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice”. Journal of Hepatology **52**:913-920.

Organização Mundial de Saúde (WHO) 2013. “Obesity and overweight”. Fact sheet N. 311.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degan B, Muller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G (2000). “Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA”. Nature **408**:86-89.

Pausova Z (2006). “From big fat cells to high blood pressure: a pathway to obesity-associated hypertension”. Curr Opin Nephrol Hypertens **15**(2):173-8.

Pereira LO, Francischi RP, Lancha AH (2003). “Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina”. Arq Bras Endocrinol Metab **47**(2):111-127.

Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2008 – 2009.
[<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/imprensa/ppts/0000000108.pdf>]

Pinheiro ARO, Freitas SFT, Corso ACT (2004). “Uma abordagem epidemiológica da obesidade”. Rev. Nutr **17**(4):523-533.

Plagemann A, Harder T, Melchior K, Rake A, Rohde W, Dörner G (1999a). “Elevation of hypothalamic neuropeptide Y-neurons in adult offspring of diabetic mother rats”. Neuroreport **10**(15):3211-6.

Popkin BM, Ge K, Guo, X, Ma H, Zohoori N (1993). “The nutrition transition in China: A cross sectional analysis”. Eur J Clin Nutr **47**:333-46.

Powell EE, Cooksley WG, Hanson R, Searle J, Halliday JW, Powell LW (1990). “The natural history of nonalcoholic steatohepatitis: a follow-up study of forty two patients for up to 21 years”. Hepatology **11**:74–80.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M (2004). “A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion”. Nature **432**(7014):226-30.

Raman RP (2002). “Obesity and Healthy risks”. J Am Coll Nutr **21**(2):134S-9S.

Rayner KJ, Sheedy FJ, Esau CC, Hussain FN, Temel RE, Parathath S, van Gils JM, Rayner AJ, Chang AN, Suarez Y, et al. (2011). “Antagonism of miR-33 in mice promotes reverse cholesterol transport and regression of atherosclerosis”. J Clin Invest **121**:2921-2931.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) “The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*”. Nature **403**:901-906.

Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowleson A, Poston L, Taylor PD (2008). “Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming”. Hypertension **51**(2):383-92.

Schrem H, Klempnauer J, Borlak J (2002). “Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression”. Pharmacol Rev **54**:129-158.

Semenkovich CF (2006). “Insulin resistance and atherosclerosis”. The Journal of Clinical Investigation **116**(7):1813-22.

Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronnis MJJ, Bagder TMI (2008). “Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring”. Am J of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **294**:528-538.

Shoelson SE, Lee J, Goldfine AB (2006). “Inflammation and Insulin Resistance”. J Clin Invest, **116**(7)1793-1801.

Simmons D (2011). “Diabetes and obesity in pregnancy”. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology **25**:25–36.

Siomi H, Siomi MC (2010). “Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals”. Molecular Cell **38**:323-332.

Stein CJ, Colditz GA (2004). “The epidemic of obesity”. J Clin Endocrinol Metab **89**(6):2522-5.

Strauss AW, Powell CK, Hale DE, et al. Molecular basis of human mitochondrial very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency causing cardiomyopathy and sudden death in childhood(1995). Proc Natl Acad Sci **92**:10496-10500.

Takanabe R, Ono K, Abe Y, Takaya T, Horie T, Wada H, Kita T, Satoh N, Shimatsu A, Hasegawa K (2008). “Up-regulated expression of microRNA-143 in association with obesity in adipose tissue of mice fed high-fat diet”. Biochem Biophys Res Commun **376**:728-732.

Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, Chen HC, Lee CH, Tsai TF, et al. (2012). “MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis”. J Clin Invest **122**:2884-2897.

Van Assche FA, Aerts L (1985). “Long-term effect of diabetes and pregnancy in the rat. Diabetes”. Suppl **2**:116-8.

Vernon G, Baranova A, Younossi ZM (2011). "Systematic review: the epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis in adults". Aliment Pharmacol Ther **34**:274-285.

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

Wajchenberg BL, Nery M, Cunha MR, Silva MER (2009). "Adipose tissue at the crossroads in the development of the metabolic syndrome, inflammation and the atherosclerosis". Arq Bras Endocrinol Metab **53**(2):145-150.

Waterland RA, Garza C (1999). "Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease". Am J Clin Nutr **69**:179-97.

Welch CL, Xia YR, Edwards PA et al. (1998). "Assignment of Gpam to distal mouse chromosome 19 by linkage analysis". Mamm Genome **9**(1):93-93.

Westwater JO, Fainer D (1958). "Liver impairment in the obese". Gastroenterology **34**(4):686-93.

Wilfred BR, Wang WX, Nelson PT (2007). "Energizing miRNA research: a review of the role of miRNAs in lipid metabolism, with a prediction that miR-103/107 regulates human metabolic pathways". Mol Genet Metab **91**(3):209-17.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs (2009). “Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation”. Nature Cell Biology **11**:228-234.

Xu H, He JH, Xiao ZD, Zhang QQ, Chen YQ, Zhou H, Qu LH (2010). “Liver-enriched transcription factors regulate microRNA-122 that targets CUTL1 during liver development”. Hepatology **52**:1431-1442.

Whittaker R, Loy PA, Sisman E, Suyama E, Aza-Blanc P, Ingermanson RS, Price JH & McDonough PM (2010). “Identification of MicroRNAs that control lipid droplet formation and growth in hepatocytes via high-content screening”. J Biomol Screen **15**:798-805.

Zhang J, Wang C, Terroni PL, Cagampang FR, Hanson M, Byrne CD (2005). “High-unsaturated-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet during pregnancy and lactation modulates hepatic lipid metabolism in female adult offspring”. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **288**:R112–R118.

Zhang J, Zhang F, Didelot X, Bruce KD, Cagampang FR, Vatish M, Hanson M, Lehnert H, Ceriello A, Byrne CD (2009). “Maternal high fat diet during pregnancy and lactation alters hepatic expression of insulin like growth factor-2 and key microRNAs in the adult offspring”. BMC Genomics **16**:10-478.

Zhen-Ya Li, Yang Xi, Wen-Nan Zhu, Chao Zeng, Zhu-Qin Zhang, Zhi-Chen Guo, De-Long Hao, Guang Liu, Lei Feng, Hou-Zao Chen, Feng Chen, Xiang Lv, De-Pei Liu, Chih-Chuan Liang (2011). “Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4 α ”. Journal of Hepatology **55**: 602-611.

APÊNDICE



CEUA/Unicamp

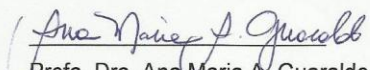
Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

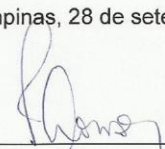
CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Avaliação da expressão hepática de microRNAs relacionados ao metabolismo lipídico na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta" (protocolo nº 2864-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni / Rafaela Benatti de Oliveira, 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 28 de setembro de 2012.

Campinas, 28 de setembro de 2012.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guinaldo
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.lb.unicamp.br/ceea/>

Artigos Submetidos

1. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and miR-122 and miR-370 expression in offspring. Benatti, R.O.; Melo, A.M.; Borges, F.O.; Ignacio-Souza, L.M.; Torsoni, M.A.; Milanski, M.; Velloso, L.A.; Torsoni, A.S. **British Journal of Nutrition.**

2. Hypothalamic and hepatic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring from obese mice. Melo, A.M.; Benatti, R.O.; Ignacio-Souza, L.M.; Okino, C.; Torsoni, A.S.; Milanski, M.; Velloso, L.A.; Torsoni, M.A. **Journal of Endocrinology.**

Apresentações em Congressos

1) DAMS FED HIGH-FAT DIET DURING PREGNANCY AND LACTATION: IMPLICATIONS IN HEPATIC MICRORNA AND LIPOGENIC GENES EXPRESSION IN OFFSPRING. BENATTI RO, MELO AM, BORGES FO, IGNÁCIO-SOUZA LM, VELLOSO LA, TORSONI MA TORSONI AS. XLII Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguauçu- Paraná.

2) CONSUMPTION OF HIGH-FAT DIET DURING PREGNANCY AND LACTATION MODULATES MICRORNA INVOLVED IN CONTROL OF LIPOLITIC GENES EXPRESSION. BORGES FO, BENATTI RO, MELO AM, LEMES SF, SIMINO LAP, VELLOSO LA, TORSONI MA TORSONI AS. XLII Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguauçu-Paraná.

3) MATERNAL CONSUMPTION OF HIGH FAT DIET ACTIVATES PROTEINS RELATED TO ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS IN THE OFFSPRING MICE. MELO AM, BENATTI RO, ASHINO NG, IGNÁCIO-SOUZA LM, VELLOSO LA, TORSONI MA TORSONI AS. XLII Annual Meeting of The Brazilian Biochemistry and Molecular Biology Society. Foz do Iguacu- Paraná.

4) MATERNAL CONSUMPTION OF HIGH-FAT DIET DURING PREGNANCY AND LACTATION LEADS TO MODULATION OF MICRORNA EXPRESSION RELATED TO LIPID METABOLISM. BENATTI RO, MELO AM, ASHINO NG, IGNÁCIO-SOUZA LM, VELLOSO LA, TORSONI MA TORSONI AS. 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics. São Paulo-SP.

5) OFFSPRING FROM DAMS FED HIGH-FAT DIET DURING PREGNANCY AND LACTATION PRESENTED ACTIVATION OF ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS. MELO AM, BENATTI RO, ASHINO NG, IGNÁCIO-SOUZA LM, VELLOSO LA, TORSONI MA TORSONI AS. 6th Congress of the International Society of Nutrigenetics / Nutrigenomics. São Paulo-SP.

6) O CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO ALTERAM A EXPRESSÃO HEPÁTICA DE MICRORNAS E GENES RELACIONADOS AO METABOLISMO LIPÍDICO. BENATTI RO, MELO AM, ASHINO NG, SOUZA LM, VELLOSO LA, TORSONI MA TORSONI AS. 10º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo. Ribeirão Preto- SP.

7) ATIVAÇÃO HIPOTALÂMICA E HEPÁTICA DE PROTEÍNAS DA UNFOLDED PROTEIN RESPONSE (UPR) EM PROLE DE MÃES ALIMENTADAS COM DIETA HIPERLIPÍDICA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO. MELO AM, BENATTI RO, ASHINO NG, SANTOS GA, CURSINO J, VELLOSO LA, TORSONI AS, TORSONI MA. 10º Congresso Paulista de Diabetes e Metabolismo. Ribeirão Preto- SP.

8) MATERNAL CONSUMPTION OF HIGH FAT DIET INCREASES THE EXPRESSION OF SPECIFIC MICRORNAS AND LIPOGENIC GENES IN THE OFFSPRING OF MICE. TORSONI, A., BENATTI, RO., MELLO, A., VELLOSO, LA., TORSONI, M. 19th European Congress on Obesity (ECO 2012) Lyon, France.

9) HYPOTHALAMIC INSULIN RESISTANCE AND ENDOPLASMATIC RETICULUM STRESS IN OFFSPRING FROM DAMS FED HIGH FAT DIET DURING PREGNANCY AND LACTATION. ASHINO, NG., CURSINO, J., SANTOS, GA., BENATTI, RO., VELLOSO, LA., TORSONI, AS., TORSONI, MA. First Brazilian International Symposium on Integrative Neuroendocrinology.