

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Nicole Corrêa Guimarães

**Homeostase Glicêmica na Prole de
Camundongos com Obesidade Induzida por Dieta
Hiperlipídica: o Papel da Sinalização da Insulina**

Campinas

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

NICOLE CORRÊA GUIMARÃES

**“Homeostase Glicêmica na Prole de Camundongos
com Obesidade Induzida por Dieta Hiperlipídica: o Papel
da Sinalização da Insulina”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
Nicole Corrêa Guimarães
[Assinatura]
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestra em Biologia Funcional e
Molecular na área de Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL'EVEDOYE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G947h

Guimarães, Nicole Corrêa, 1987-
Homeostase glicêmica na prole de camundongos
com obesidade induzida por dieta hiperlipídica: o papel
da sinalização da insulina / Nicole Corrêa Guimarães. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Marcio Alberto Torsoni.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Imprint metabólico. 2. Obesidade. 3.
Resistência à insulina. 4. Diabetes Mellitus Tipo 2. 5.
Dieta hiperlipídica. I. Torsoni, Marcio Alberto, 1967-.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Glucose homeostasis in the offspring of hyperlipidic diet-induced obese mice: the role of insulin signaling

Palavras-chave em Inglês:

Metabolic imprinting

Obesity

Insulin resistance

Type 2 Diabetes Mellitus

Hyperlipidic diet

Área de concentração: Bioquímica

Titulação: Mestre em Biologia Funcional e Molecular

Banca examinadora:

Marcio Alberto Torsoni [Orientador]

Helena Coutinho Franco de Oliveira

Marciane Milanski

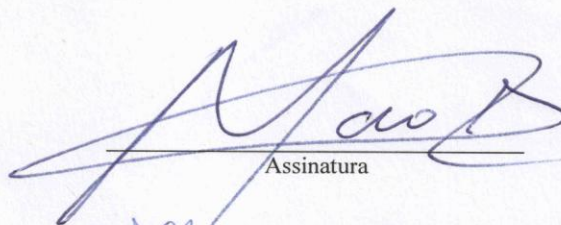
Data da defesa: 14-12-2012

Programa de Pós Graduação: Biologia Funcional e Molecular

Campinas, 18 de janeiro de 2013

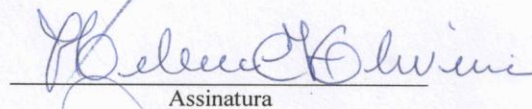
BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni (Orientador)



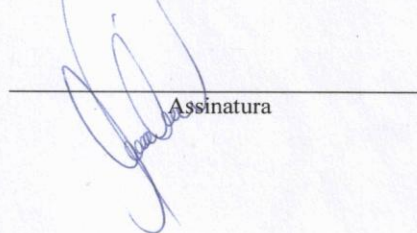
Assinatura

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco de Oliveira



Assinatura

Profa. Dra. Marciane Milanski Ferreira



Assinatura

Profa. Dra. Dora Maria Grassi Kassisse

Assinatura

Profa. Dra. Mônica Marques Telles

Assinatura

RECONHECIMENTO

A realização deste estudo só foi possível com o apoio da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de mestrado, processo de número 2010/04172-2 e pelo apoio ao projeto de número 2009/54273-2 concedido ao Prof^o Dr. Marcio Alberto Torsoni.

“Aos meus pais, Maria de Lourdes Corrêa Guimarães e Evaldo de Oliveira Guimarães, minha base, meu lar onde eu estiver, dedico este trabalho”

**“Άσε την τροφή να γίνει το φάρμακο σου,
και φάρμακο να γίνει η τροφή σου”**

**“Que teu alimento seja o teu medicamento
e teu medicamento o teu alimento”-
Hipócrates, 400 a.C**

AGRADEÇO:

PRIMEIRA e invariavelmente a Deus. Ou a um conceito um tanto particular de Deus a que me dirijo e refiro. Consciência Universal criadora de tudo o que há, conceito tal que em nada conflita com os saberes temporais humanos e suas ciências. A que devo a sorte ou providência de haver nascido de **Maria de Lourdes e Evaldo**, ao lado de **Luana**, meus heróis humanos, perfeitos e perfeitamente falíveis, alicerces do meu caráter, melhores **MESTRES**, que (quase sempre) com paciência souberam lidar com meus medos e me orientar da melhor forma possível, para que eu pudesse livremente, agir de forma absolutamente oposta, sem jamais perder suas bênçãos.

AO meu orientador **Marcio Torsoni**, um grande professor, cujas lições transcenderam, em muito, os limites da bioquímica. Junto a ele e à Prof^a **Adriana Torsoni**, nas rotinas simples de laboratório, nas resoluções de problemas corriqueiros, nas broncas que levei (e mereci), nos resultados esperados, inesperados, inexplicáveis e malfeitos, aprendi que a ciência se faz das dúvidas, das tentativas, dos erros e principalmente da humildade em reconhecer que muito pouco sabemos, e que só assim podemos alcançar algum saber.

AOS colegas de laboratório que gentilmente me prestaram todo tipo de auxílio que precisei. Desde o LabDiMe (ainda em Mogi) em que, no início destes experimentos, compartilhei momentos inesquecíveis ao lado de muitos que trabalharam comigo, em especial a amiga **Fernanda**, ao LabSinCel, do Prof^o **Lício Velloso**, aonde fui muito bem acolhida (um tanto perdida) nesta mudança, por todos os que lá laboram, em especial pela atenciosa **Erica Anne**. Dentre todos, destaco ainda os colegas: **Gustavo, Arine e Rafaela**, cuja ajuda foi imprescindível na realização deste trabalho.

AOS amigos, que a tal providência alinhou em meu caminho, especialmente nesses pouco mais de dois anos, que me mostraram que sem amigos se inspira, expira, trabalha e dorme ... mas não se vive. Que não foram somente alvo das minhas distrações, como também fonte de ajuda, “programa ‘deu pau’; impressora ‘pifou’; carona não veio...” a tudo dava-se um jeito, se não a resolução do problema, que fosse o meu resgate de dentro do problema. Em especial dentre eles, meus queridos: **Pedro, Rapha, Russo, Natalia, Lucas, Angélica, Amanda e Marina.**

AOS membros da banca, titulares e suplentes: **Helena Oliveira, Marciane Milanski, Mônica Telles e Dora M^a G. Kassisse**, que se dispuseram a avaliar este trabalho e contribuir para seu aprimoramento. Também aos avaliadores do exame de qualificação **Everardo Carneiro e Carmen Veríssima**, cuja colaboração foi de suma importância para a conclusão desta dissertação.

TAMBÉM à **FAPESP**, pela concessão da bolsa de mestrado sem a qual a elaboração deste estudo seria impossível.

POR último, mas não menos importantes, agradeço às vidas e corpos de cada **camundongo** que utilizei, com os quais espero haver empregado o tratamento mais ético possível aos tempos atuais, e na esperança de que a ciência, como conhecemos, esteja em transformação, encaminhando-se à amenização de tais danos ainda necessários.

A todos os citados, e mesmo aos esquecidos, meu **MUITO OBRIGADA!**

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC- Acetil Co-A Carboxilase

AGRP- Proteína relacionada ao Agouti

AKT- Proteína Quinase B

AMPK- Proteína Quinase dependente de AMP

ChREBP- Proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos

DM2- *Diabetes Mellitus* tipo 2

EHNA- Esteatose hepática não alcoólica

FAS- Ácido Graxo Sintase

FKHR Proteína Forkhead

GAPDH Gliceraldeído-3-fosfato

GK- Glicoquinase

GLUT4- Transportador de glucose 4

GPR120- Receptor acoplado à proteína G 120

HN- Prole de mães tratadas com dieta hiperlipídica

IKB- Inibidor do Kappa B

IKK- IKB- Quinase

JNK- Jun-N-terminal Quinase

NN- Prole de mães tratadas com dieta padrão

PEPCK- Fosfoenolpiruvato Quinase

PI3K- Fosfatidilinositol 3 quinase

POMC- Pró-ópio-melanocortina

SREBP- Proteína de ligação ao elemento de resposta a esteróis

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α

VLDL- Lipoproteína de muito baixa densidade

α MSH- Hormônio estimulante de melanócitos

RESUMO

A obesidade é precursora de co-morbididades como o *Diabetes Mellitus* tipo 2 e doenças vasculares. Estudos demonstram que a composição da dieta materna durante a gestação pode modular o metabolismo da prole, promovendo um ajuste funcional conhecido como *imprint* metabólico, predispondo a prole ao ganho de peso e resistência da insulina (RI). A RI está diretamente relacionada com a adiposidade e com o aumento no nível de citocinas pró-inflamatórias no sangue. Estas citocinas são responsáveis pela ativação de serina-quinases que podem promover a redução do sinal intracelular. Considerando que o hipotálamo desempenha importante função no controle da homeostase energética e do metabolismo periférico, a alteração na expressão e ativação de proteínas chave neste tecido pode trazer consequências importantes para o organismo. Desta maneira, o presente estudo avaliou proteínas hipotalâmicas e hepáticas que possam ser moduladas pelo uso materno de dieta rica em gordura animal. Para isso foram utilizadas proles de camundongos fêmeas que fizeram uso de dieta rica em gordura (grupo HN) ou dieta padrão (grupo NN) durante o período de gestação e lactação e com idade de 4 e 12 semanas (4S e 12S) de vida. Inicialmente foram avaliados o ganho de peso, massa adiposa, a tolerância a glicose, os níveis séricos de insulina e citocinas pró-inflamatórias, a deposição hepática de gordura por histologia e o conteúdo de triglicérides hepáticos. As alterações metabólicas relacionadas à manutenção da homeostase glicêmica e do balanço energético foram avaliadas pela análise do conteúdo e/ou ativação das proteínas JNK, IKK, NFkB, AKT, IR, IRS1, IRS2, ACC, FAS, AMPK, PEPCK e HSL nos tecidos hepático, hipotalâmico e adiposo utilizando a técnica de *Western Blot*. A prole das fêmeas tratadas com a dieta especial apresentou maior ganho de peso e massa adiposa epididimal, menor tolerância à glicose, maior deposição hepática de gordura no fígado e maiores níveis de triglicérides hepáticos (4 e 12S), maiores níveis sanguíneos de insulina, TNF α , IL1 β (12S). As serina

quinases JNK e iKK estavam mais fosforiladas no fígado (4 e 12S) e hipotálamo (4S). A proteína NFκB estava mais presente no grupo HN em ambos os tecidos (4S). A proteína AKT apresentou menor fosforilação após estímulo com insulina no hipotálamo (4S) e fígado do grupo HN, bem como o IR, IRS1 e 2 (12S). A proteína PEPCK foi encontrada em maior quantidade no fígado dos animais HN (12S), A proteína FAS foi encontrada em maiores níveis no fígado dos animais HN (4S), entretanto o inverso foi observado na idade de 12 semanas. A enzima HSL estava menos fosforilada no tecido adiposo do grupo HN (12s). A proteína ACC hepática do grupo HN estava menos fosforilada em seu estado basal nos dois períodos, no hipotálamo a fosforilação da ACC não foi diferente do grupo NN (4s). O grupo HN apresentou menor desfosforilação da AMPK por estímulo de insulina. A partir destes resultados observamos que a nutrição hiperlipídica pré-natal foi capaz de influenciar negativamente a homeostase glicêmica da prole, além de modular as vias lipogênicas e o controle do balanço energético.

ABSTRACT

Obesity is a condition that precedes co-morbidities as type 2 *Diabetes Mellitus* and vascular diseases. Studies demonstrate that the composition of the maternal diet during gestation can modulate offspring's metabolism, leading to a functional adjustment known as metabolic imprint, which predisposes the offspring to weight gain and insulin resistance (IR). IR is directly related to adiposity and the blood level of pro-inflammatory cytokines. These cytokines are responsible for the activation of serine-kinases that can promote a reduction of the intracellular signal. Considering that the hypothalamus plays an important role on the control of energetic homeostasis and peripheral metabolism, the alteration on the expression and activation of key proteins in this tissue may lead to important consequences to the organism. This way, the present study evaluated hypothalamic and hepatic proteins that can be modulated by the maternal use of animal fat rich diet. For that, offsprings of female mice fed a high fat diet (HN group) or standard diet (NN group) during pregnancy and lactation, at the ages of 4 and 12 weeks old (4W and 12W) were used. Initially weight gain, adipose mass, glucose tolerance, serum levels of insulin and pro-inflammatory cytokines, liver fat depot by histology, and liver triglycerides content were evaluated. The metabolic alterations related to the maintenance of glycemic homeostasis and energy balance were evaluated through the analysis of the expression and/or activation of the proteins JNK, IKK, NF κ B, AKT, IR, IRS1, IRS2, ACC, FAS, AMPK, PEPCK and HSL in the liver, hypothalamus and adipose tissue using western blot technique. The offspring of the dams treated with the special diet presented higher weight gain and epididymal adipose mass, lower glucose tolerance, higher hepatic fat deposition and higher levels of liver triglycerides (4 and 12W), higher levels of blood insulin, TNF α and IL1 β (12W). The serine-kinases JNK and IKK were more phosphorylated in the liver (4 and 12W) and hypothalamus (4W). The NF κ B was found at a higher amount in both

tissues (4W). The AKT presented lower phosphorylation after stimulation with insulin in the hypothalamus (4W) and liver of HN group, as the IR, IRS1 and 2 were more expressed (12W). PEPCK was found in higher quantity in the liver of HN animals (12W). FAS was found in higher levels in the liver of HN animals (4W), however the opposite was observed at the age of 12 weeks. The enzyme HSL was less phosphorylated in the adipose of HN group (12W). Hepatic ACC of HN group was less phosphorylated in its basal state at both ages, in the hypothalamus the phosphorylation of ACC was not different of NN group (4W). HN group showed lower dephosphorylation of AMPK with insulin stimulation. By these results we observe that the pre-natal hyperlipidic nutrition was able to influence negatively the glucose homeostasis of the offspring, besides the modulation of the lipogenic pathways and energy balance control.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Dados epidemiológicos	2
1.2. Desenvolvimento pré-natal da obesidade	3
1.3. Esteatose hepática não alcoólica	8
1.4. Resistência à insulina	9
1.5. Modulação central da homeostase energética	12
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo Geral	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. METODOLOGIA	17
3.1. Animais experimentais	18
3.2. Anestesia	18
3.3. Teste de tolerância á glicose (GTTip)	18
3.4. Procedimento para extração de tecidos para análise pelo método de <i>Western Blot</i>	19
3.5. <i>Western Blot</i>	20
3.6. Forma de análise dos resultados	21
4. RESULTADOS	22
CAPÍTULO I- Primeira fase experimental	23
<i>Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver</i>	
<i>Abstract</i>	24
<i>1. Introduction</i>	25
<i>2. Materials and Methods</i>	27
<i>2.1. Animals and diet</i>	27
<i>2.2. Sample collection and analysis</i>	27
<i>2.3. Evaluation of liver histology and triglyceride content</i>	28
<i>2.4. Immunoprecipitation and immunoblotting</i>	28
<i>2.5. Data presentation and statistical analysis</i>	29

3. Results	29
3.1. Body weight, food intake and adiposity	29
3.2. Liver lipid content and histological analysis	30
3.3. Plasma analysis	30
3.4. Expression and activation of proteins of insulin Signaling in the liver	30
3.5. Liver p-ACC, FAS, and PEPCK expression	31
3.6. JNK, IKK and HSL phosphorylation	31
4. Discussion	32
Acknowledgement	37
References	37
Legends	42
CAPÍTULO II- Segunda fase experimental	52
II.1. Tolerância à glicose	52
II.2. Análise da expressão e/ou fosforilação das proteínas: JNK, NFkB e IKK	52
II.3. Avaliação da fosforilação da proteína AKT hipotalâmica	52
II.4. Análise da expressão e/ou fosforilação das proteínas: ACC, FAS e AMPK	53
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÃO	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXO: Certificado- CEUA	89

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dados epidemiológicos

A obesidade é hoje, reconhecidamente, um distúrbio metabólico de proporções epidêmicas nas populações ocidentais, também considerada uma epidemia global, alcunhada atualmente de “globesidade” pela Organização Mundial de Saúde (DESAI *et al*, 2004; WHO, 2010). Dentre os fatores associados ao desenvolvimento de obesidade, a alimentação hipercalórica (rica em gorduras e carboidratos) e o sedentarismo tem participação importante na prevalência deste distúrbio (DESAI *et al*, 2007).

Estima-se que cerca 1,5 bilhão de pessoas com idade superior a 20 anos apresentem sobrepeso (índice de massa corpórea superior a 25 kg/m²). Destes aproximadamente 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres estão classificados como obesos, ou seja, apresentam IMC superior a 30 kg/m². Deste fenômeno resulta um alarmante número de óbitos provocados por doenças relacionadas à obesidade, 2,8 bilhões de adultos por ano em todo o mundo.

O Brasil tem acompanhado a evolução deste problema com números semelhantes aos de países desenvolvidos. Atualmente, cerca de 42% dos brasileiros apresentam sobrepeso, enquanto 16% são obesos (WHO, 2011). Previsões de estudos da Organização Mundial de Saúde mostram que a obesidade pode atingir 1/4 da população mundial até o ano de 2025 (WHO, 2011) e um fator de grande contribuição à esta estimativa é o aumento da prevalência da obesidade entre as crianças. Até o ano de 2010 cerca de 43 milhões de crianças com idade inferior a 5 anos apresentavam obesidade, sendo a maioria do sexo feminino. Curiosamente, desta amostra cerca de 35 milhões de crianças obesas vivem em países em desenvolvimento, enquanto apenas 8 milhões são de países desenvolvidos. Tal discrepância provavelmente se deve ao fato de que países desenvolvidos combatem o

avanço desta prevalência por meio de políticas públicas de saúde mais eficazes que as dos países em desenvolvimento. Considerando que a obesidade infantil conhecidamente contribui para o desenvolvimento da obesidade e suas co-morbidades na idade adulta, as perspectivas de mudança neste quadro para as próximas gerações são reduzidas (FLEGAL *et al.*, 1998; MEI *et al.*, 1998, MEI; GRUMMER-SRAWN; SCANLON, 2003; MUST *et al.*, 1999; RITCHIE *et al.*, 2003, WHO, 2011).

O aumento na prevalência da obesidade tem também elevado o número de indivíduos que apresentam outras comorbidades. Em consequência do aumento da obesidade, atualmente o diabetes mellitus do tipo 2 (DM 2) representa um grave problema de saúde pública. Essa forma da doença corresponde a mais de 90% dos casos de diabetes. No mundo 346 milhões de pessoas sofrem da doença, e este número pode dobrar até o ano de 2030 (WHO, 2011). No ano 2000, cerca de 4,6 milhões de pessoas representavam os números do diabetes no Brasil, uma projeção de 2004 para o ano 2030 prevê que esse número pode chegar a 11,3 milhões de pessoas (WILD, *et al.*, 2004). Dentre as causas de óbito, as doenças cardiovasculares e renais representam, respectivamente, 50% e 20% dos casos entre os diabéticos (WHO, 2011).

1.2. Desenvolvimento pré-natal da obesidade

Em mulheres, a obesidade está associada ao aumento na prevalência de diversos riscos obstétricos, tais como diabetes gestacional, hipertensão, pré-eclampsia e mortalidade neo-natal (NAEYE, 1990; CASTRO; ALVINA, 2002; CNATTINGIUS *et al.*, 1998; KING, 2006). Adicionalmente, estudos recentes sugerem que a obesidade materna também está associada a danos importantes na prole.

O indivíduo em formação é sensível às condições ambientais que modulam as vias do desenvolvimento fetal e, dessa forma, as consequências

da nutrição gestacional podem modificar o desenvolvimento neural que controla a homeostase energética do feto (LEVIN, 2000). Por outro lado, indivíduos expostos a um nível aumentado de nutrientes antes do nascimento têm risco aumentado de apresentarem sobrepeso ou obesidade na fase adulta (PLAGEMANN *et al.*, 1998; SHANKAR, *et al.*, 2008; LI; SLOBODA; VICKERS, 2011).

O fenótipo de um indivíduo é resultado de uma interação complexa entre genoma, epigenoma e ambiente atual, passado e ancestral. O ambiente tem o poder de remodelar de forma permanente ou reversível o epigenoma durante toda a vida. Dessa maneira, a influência do meio pode resultar em um acúmulo de desordens gênicas precursoras da tumorigênese e de doenças relacionadas ao envelhecimento (ATTIG, 2010).

Estudos realizados por diversos pesquisadores mostram que o ambiente nutricional a que o indivíduo é exposto durante os períodos pré e pós natal podem gerar consequências importantes no desenvolvimento do sistema regulatório do metabolismo energético (BARKER; OSMOND, 1986; RAVELLI *et al.*, 1999; VICKERS *et al.*, 2000; PARENTE, *et al.*, 2008). Diversas evidências apontam que variações no estado nutricional e a exposição a hormônios relacionados ao estresse são capazes de alterar o desenvolvimento fetal e induzir modificações no fenótipo metabólico pós-natal (BURDGE, 2008).

A teoria do desenvolvimento programado de doenças metabólicas, também conhecida como *imprint* metabólico, atribui ao estado nutricional e hormonal do desenvolvimento um papel de predição do ambiente que o indivíduo experimentará após o nascimento. O estado nutricional do organismo materno representa um desafio ambiental ao indivíduo em formação como uma forma de preparo para a vida *ex útero* (LILLYCROP, 2011; DELAGE, 2008). O mecanismo desta “memória pré-natal” se dá devido à grande plasticidade gênica do organismo em desenvolvimento. Tal característica permite modificações do perfil epigenético, como a super-expressão ou silenciamento de genes relacionados à manutenção da homeostase energética. As diferenças entre tal previsão e o ambiente externo

real predispõem o organismo exposto a padrões nutricionais não ideais durante o período de formação e crescimento ao possível desenvolvimento de diversas doenças metabólicas (CHAUDHARY, 2012; GLUCKMAN, 2004; GLUCKMAN, 2007; HOWIE, 2009; LILLYCROP, 2011; MOORE, 1991; WATERLAND, 2006).

As modificações na regulação epigenética de genes específicos resultam em alterações no funcionamento de histonas. Via mudanças em proteínas responsáveis pela acetilação das mesmas, e em proteínas responsáveis pela metilação gênica. Provocando alterações na estrutura da cromatina, promovendo alterações nos processos de replicação, reparo, transcrição e segregação gênicas. Este fenômeno pode ser responsável pelo comprometimento, inclusive, do comportamento metabólico de gerações futuras, considerando que tais alterações atingem também as células gametogênicas (CHAUDHARY, 2012; DELAGE, 2008; FRANKS; LING, 2010; LILLYCROP, 2011).

Em grávidas com complicações, tais como diabetes gestacional e hiperglicemia decorrente da intolerância a glicose, é comum se observar maior insulinemia e glicemia fetal e prole com maior risco de apresentar diabetes tipo 2 na fase adulta (SILVERMAN *et al.*, 1991; SILVERMAN *et al.*, 1998). Desta maneira, a avaliação de um modelo de estudo utilizando ratos alimentados, com dieta rica em gordura animal durante a gestação e lactação, permitiu identificar a presença de anormalidades cardiovasculares e metabólicas na prole adulta com características comuns às da síndrome metabólica encontrada em humanos, incluindo a hipertensão, a dislipidemia e hiperglicemia (KHAN *et al.*, 2003; KHAN *et al.*, 2004; TAYLOR *et al.*, 2003). Em outro estudo observou-se a correlação entre a dieta hipercalórica pré e pós natal (a partir da idade adulta) e alterações significativas na expressão hipotalâmica de neurônios responsáveis pelo controle da ingestão como NPY e POMC. Resultando em hiperfagia, maior adiposidade, hiperlipidemia, intolerância à glicose e resistência à insulina na prole (CHEN, 2009). A literatura científica atual sugere a hipótese de que um “ciclo vicioso” causado

pela obesidade materna desencadeie em maior prevalência da obesidade infantil (SHANKAR *et al.*, 2008).

A Síndrome Metabólica é uma condição diretamente associada à obesidade e ao DM 2 e consiste em complicações como acúmulo de gordura nas paredes de veias e artérias, levando à aterosclerose, precursora de doenças como doença vascular periférica, AVC (acidente vascular cerebral), doença coronariana, hipertensão arterial, retinopatia e/ou catarata, insuficiência renal e gangrena. Com risco da necessidade de amputação dos membros inferiores devido a complicações da aterosclerose (PETERSEN *et al.*, 2007).

Atualmente é conhecido que o uso de dieta hiperlipídica por ratos pode levar à redução no tamanho do pâncreas, aumento do número de células β e redução do lúmen dos vasos sangüíneos do pâncreas (DUARTE *et al.*, 2006). Em contrapartida, um estudo realizado por Zhang e colaboradores em 2005 mostrou que o uso de uma dieta rica em proteína e gordura insaturada (poli-insaturada e monoinsaturada), mas pobre em carboidratos durante a gestação e lactação de camundongos, ocasionou benefícios ao metabolismo de lipídios no fígado da prole fêmea adulta, reduzindo também as concentrações de triacilgliceróis no fígado. Conforme estudo realizado por Cambonie *et al.* (2007), o uso de antioxidantes associado à dieta hipoprotéica durante a gestação apresentou efeito preventivo no desenvolvimento de hipertensão e demais disfunções vasculares na prole adulta de ratos. Eventos pré-natais como insuficiência placentária e estresse oxidativo promovem alterações no crescimento na infância com redução da massa muscular esquelética, diminuição da sensibilidade à insulina, disfunções mitocondriais e elevados riscos do desenvolvimento da síndrome metabólica na idade adulta (THOMPSON; REGNAULT, 2011). Estudos populacionais demonstram um aumento na prevalência do desenvolvimento precoce da síndrome metabólica, especialmente em gestantes, com severidade crescente de geração em geração. Isto ocorre pelo efeito transgeracional oriundo da deleção incompleta

de marcas epigenéticas precursoras da síndrome metabólica (GALLOU-KABANI; VIGÉ; JUNIEN, 2007; JUNIEN *et al*, 2005).

O consumo materno de dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação também produz efeitos deletérios sobre o sinal da leptina da prole. Este efeito é consequência da hiperleptinemia apresentada pelas mães durante a gestação e lactação e esta alteração está diretamente ligada ao aumento da ingestão e ganho de peso (KIRK, *et al*, 2009).

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 (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. Utilizando-se do mesmo modelo, porém valendo-se de subnutrição pré-natal e super-nutrição pós-natal Desai (2007) mostrou diferenças na composição corpórea, glicemia e lipidemia 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 a hiperfagia e ganho de peso (FAHRENKROG, *et al*, 2004).

Em adição ao ambiente hipercalórico durante o desenvolvimento, as influências da função mitocondrial também devem ser consideradas (exclusiva de herança materna). Esta organela é responsável pela maior parte da oxidação dos ácidos graxos, e disfunções mitocondriais podem estar relacionadas ao desenvolvimento de esteatose hepática não alcoólica e esteatohepatite não alcoólica. Atualmente estudos têm relacionado o consumo de dietas hiperlipídicas durante o período gestacional e de lactação ao surgimento dessas patologias em ratos adultos (BRUCE, *et al*, 2009; CARDOSO; QUELCONI; KOWALOSKI, 2010).

1.3. Esteatose hepática não alcoólica

A principal manifestação hepática relacionada à síndrome metabólica, a esteatose hepática não alcoólica (EHNA), caracterizada pelo acúmulo de lipídios (predominantemente triacilgliceróis) excedendo 5% da massa hepática, também vem sendo associada às influências da dieta e do perfil lipídico materno. Recentes estudos demonstram que o fenótipo lipídico pode ser influenciado pela dieta materna ao apresentar alterações características de EHNA na prole ratas tratadas com dieta hiperlipídica (SONG, *et al*, 2012; SOUZA *et al*, 2012). Resultante de fatores dietéticos, massa adiposa elevada, disfunções imunológicas e da microbiota intestinal (ANGULO, 2005; MOUZAKI; ALLARD, 2012), a EHNA é a doença hepática mais comum (6 vezes mais prevalente entre indivíduos obesos) e causa mais frequente de cirrose criptogênica e níveis elevados na produção de aminotransferase (DAS; BALAKRISHNAN, 2011; SOUZA *et al*, 2012).

Das e Balakrishnan demonstraram em 2011 que pacientes diagnosticados com EHNA apresentavam níveis reduzidos de IL4 e elevados de IL6 e TNF α , citocinas com atividade pró-inflamatória, sendo o TNF α associado ao aumento da atividade lipogênica hepática, proliferação de hepatócitos e morte celular (WULLAERT, *et al*, 2007). No mesmo estudo a EHNA também foi relacionada ao perfil lipídico dislipidêmico (níveis de LDL e VLDL aumentados) dos mesmos pacientes. Por outro lado a inibição da citocina antiinflamatória IL10 provocou efeitos deletérios à via de sinalização da insulina e, conseqüentemente, maior atividade glucogênica e lipogênica hepáticas (CINTRA, *et al*, 2008). A relação entre o quadro inflamatório subclínico associado à obesidade e o desenvolvimento de EHNA também pode ser demonstrada pela capacidade de citocinas pró-inflamatórias em promover o aumento da expressão de componentes da matriz extracelular hepática, especialmente de colágeno, resultando no processo fibrogênico conhecido da doença (FAN, *et al*, 2005).

1.4. Resistência à insulina

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).

A insulina é responsável pelo controle de diferentes processos fisiológicos, além da captação da glicose. No fígado, a insulina é o principal inibidor da neoglicogênese, além de estimular a síntese de glicogênio e de lipídios. No tecido adiposo e no tecido muscular esquelético, a insulina é capaz de também estimular a síntese e armazenamento de glicogênio em adição ao seu efeito de induzir a captação de glicose. Para que estes processos sejam eficientemente induzidos, é necessário que proteínas sejam ativadas no citoplasma.

A insulina se liga a um receptor localizado na membrana da célula, composto por duas subunidades α e duas subunidades β , que estão unidas por uma ponte de dissulfeto. As subunidades α são extracelulares e são responsáveis por reconhecer a insulina. As subunidades β possuem uma parte exposta no meio extracelular e uma parte responsável pela transmissão do sinal intracelular. A partir da ligação da insulina ao receptor (IR), este é ativado por auto-fosforilação. A atividade quinase do receptor promove a fosforilação de vários substratos protéicos, entre eles o substrato do receptor de insulina (IRS1, IRS2, IRS3, IRS4 e IRS5). As funções fisiológicas do IRS-1 e IRS-2 foram descobertas pela utilização de camundongos que foram geneticamente modificados. Os animais que não expressam IRS-1 são insulino-resistentes e apresentam retardo no crescimento. Os que não expressam IRS-2 são hiperglicêmicos devido a diversas anormalidades na ação da insulina nos tecidos periféricos e apresentam diminuição da massa

das células β pancreáticas que não secretam mais insulina (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Os IRS são responsáveis pela propagação do sinal da insulina através da fosfatidil-inositol-3 quinase (PI3K). Esta enzima ativada é responsável pela fosforilação de fosfatidilinositóis de membrana que resultará na fosforilação e ativação da proteína quinase B, também conhecida como AKT. Esta serina quinase está intimamente ligada à translocação do GLUT4 para a membrana e captação de glicose pelos tecidos dependentes de insulina (COLLINS; COTRAN; KUMAR, 2000; CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002).

Além de seu efeito clássico sobre a homeostase glicêmica, a insulina também tem importante papel no controle transcricional de proteínas envolvidas com a síntese e degradação de ácidos graxos e de carboidratos. Contudo, é conhecido que os carboidratos e os ácidos graxos saturados e insaturados podem participar da modulação da transcrição de vários genes através da ativação dos fatores de transcrição SREBP (proteína de ligação ao elemento de resposta a esteróis), ChREBP (proteína de ligação ao elemento de resposta a carboidratos) e FKHR (proteínas ForkHead). Através destes fatores de transcrição, várias proteínas envolvidas com o metabolismo da glicose e de ácidos graxos são moduladas a nível gênico (acetil-CoA carboxilase-ACC, ácido graxo sintase-FAS, fosfoenolpiruvato carboxiquinase-PEPCK, glicoquinase- GK, fosfofrutoquinase-PFK) (DENTIN *et al.*, 2005; JUMP *et al.*, 2005). Estes mecanismos colocam a insulina e os nutrientes presentes na dieta em destaque no complexo arsenal celular para controle do metabolismo. Desta maneira um defeito em qualquer uma das proteínas envolvidas no processo acima pode levar a uma resposta ineficiente do tecido à insulina. Outra proteína sujeita a alterações do estado metabólico e nutricional é a GPR120, um receptor de ácidos graxos insaturados de cadeia longa que tem importante papel na manutenção fisiológica da adipogênese, preferência alimentar e apetite. Indivíduos obesos apresentam maior expressão do gene da GPR120 em adipócitos, entretanto, uma mutação que produz a variante p.R270H inibe a atividade desta proteína. Camundongos

deficientes de GPR120 tratados com dieta hiperlipídica desenvolveram obesidade, intolerância à glicose, esteatose hepática não alcoólica e reduzida diferenciação de adipócitos (ICHIMURA *et al.*, 2012).

Os efeitos da dieta sobre diferentes parâmetros fisiológicos têm sido estudados há cerca de 30 anos e, mais recentemente, os estudos têm procurado entender os efeitos de dietas hiperlipídicas e hipercalóricas sobre a homeostase energética e glicêmica. Neste sentido, estudos com dieta de cafeteria e dietas ricas em gordura têm mostrado a estreita relação entre o uso destas dietas, os níveis de citocinas pró-inflamatórias e o desenvolvimento da obesidade e diabetes tipo II (PRADA *et al.*, 2005; SCHULZ *et al.*, 2006, ARAÚJO *et al.*, 2007; BARBUIO *et al.*, 2007; GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; VELLOSO; ARAÚJO; DE SOUZA, 2008). Existem evidências recentes que indicam que a qualidade da gordura ingerida na dieta (saturada, monoinsaturada ou poliinsaturada) é capaz de modular positivamente ou negativamente a sensibilidade à insulina nos tecidos periféricos (LOPEZ-MIRANDA *et al.*, 2006). Um estudo realizado por Prada *et al.* (2005) mostrou que o hipotálamo, o fígado e o tecido muscular esquelético foram afetados pelo uso de uma dieta rica em caloria (*Western diet*) e a resposta deficiente à insulina nestes tecidos apresentou correlação positiva com o aumento da ativação da JNK (c-Jun N-terminal Kinase), uma serina quinase que fosforila a serina 307 do IRS-1. Além da proteína JNK, o inibidor da proteína Kappa B kinase beta (IKK β) e o Fator Nuclear Kappa beta (NFK β) também têm sido associados ao desenvolvimento de resistência à insulina. A ativação destas proteínas ocorre pelo aumento de ácidos graxos livres (AG) e de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF α e IL-1 β , características associadas à obesidade e ao uso de dietas hiperlipídicas (TILG; MOSCHEN, 2008).

Desta maneira, de acordo com as características observadas em animais com obesidade induzida por dieta, o feto, durante o desenvolvimento e lactação, está exposto a condições que podem contribuir para o desenvolvimento de obesidade e diabetes. Em um estudo em que foi

administrado IL-6 ou TNF α durante a gestação de ratas foi possível observar na prole com 10 semanas de vida, maior ganho de peso e massa de tecido adiposo branco, e maiores níveis de leptina e insulina (DAHLGREN *et al.*, 2001). Shankar *et al.* (2008), demonstraram que a prole de camundongos obesos apresentou aumento do ganho de peso, principalmente, devido ao aumento de massa adiposa. Estudos realizados por Caluwaerts e colaboradores (2007) revelaram que a expressão da citocina pró-inflamatória TNF α e a intolerância à glicose é maior na prole de 21 dias de ratos com obesidade induzida por dieta.

Os dados encontrados na literatura sugerem que a prole de mães com obesidade induzida por dieta hiperlipídica apresenta alterações importantes nos mecanismos centrais de controle da saciedade, do gasto energético e na sinalização hormonal.

1.5. Modulação central da homeostase energética

O sistema nervoso central desempenha papel importante na homeostase energética por apresentar diversos componentes estruturais capazes de perceber mudanças hormonais e nutricionais sistêmicas. Dentre estes componentes, os neurônios conhecidos como sensores-metabólicos localizados em áreas hipotalâmicas são capazes de receber informações pelo reconhecimento de nutrientes e hormônios (desde que apresentem receptores para leptina e insulina). E a partir destas informações, medeiam o comportamento alimentar e metabólico envolvido no controle da homeostase energética (LEVIN, 2006). Estes neurônios são encontrados principalmente no núcleo arqueado do hipotálamo e apresentam proteínas tais como a AMPK/ACC e mTOR que são moduladas pela disponibilidade de energia e nutrientes, e ainda expressam neuropeptídeos que podem controlar a fome e o gasto energético.

A maturação hipotalâmica inicia-se no período pré-natal e se prolonga ao período pós-natal e, portanto, alterações metabólicas nesta fase podem

contribuir de maneira definitiva para um distúrbio metabólico. Gupta (2008) demonstrou que a prole de ratos gerados em ambiente excessivamente nutritivo apresentou níveis de expressão de mRNA dos neuropeptídeos Y e AGRP elevada. Em outro estudo, o consumo do leite de mães diabéticas resultou em aumento da expressão de NPY e AGRP (orexígenos) e redução da expressão de POMC e α -MSH (anorexígenos) na prole de mães tratadas com dieta padrão (FAHRENKROG *et al.*, 2004). Estes dados mostram que existem diversos momentos em que a exposição ao excesso de nutrientes pode trazer consequências para o desenvolvimento dos mecanismos hipotalâmicos responsáveis pela homeostase energética (GUPTA, *et al.*, 2008; CHEN; SIMAR; MORRIS, 2009).

Um dos fatores responsáveis pela modulação negativa do controle da fome e saciedade no hipotálamo de proles de mães obesas é a resistência à leptina, causada pela hiperleptinemia materna (KIRK, 2009). A leptina é um hormônio anorexigênico produzido pelos adipócitos em quantidade proporcional a massa deste tecido (FÉRÉZOU-VIALA, *et al.*, 2007). A leptina é responsável pela ativação da sinalização via JAK2/STAT3 resultando em efeitos metabólicos, de saciedade e controle do gasto energético. Entretanto, assim como para a sinalização da insulina os tecidos alvos da leptina podem apresentar resistência a sua ação. Este efeito decorre da ativação de IKK e JNK no tecido por componentes da dieta (ex. ácidos graxos) e citocinas inflamatórias produzidas pelo tecido (ex. TNF α e IL1 β) (VELLOSO; ARAÚJO; SOUZA, 2008).

Desta maneira, a exposição materna a dieta rica em gordura durante a gestação e lactação poderia contribuir para o desarranjo metabólico tanto na mãe como na prole. Nossa hipótese é de que a prole de mães que fizeram uso de dieta rica em gordura pode apresentar alterações na sinalização da leptina e insulina no hipotálamo e fígado, contribuindo para as alterações metabólicas encontradas neste modelo. O experimento foi dividido em duas fases, investigamos os parâmetros metabólicos da prole em dois períodos distintos, com 4 e 12 semanas de idade.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito do uso materno de dieta rica em gordura de origem animal, durante a gestação e lactação, na manutenção da homeostase glicêmica, na sinalização da insulina no hipotálamo e fígado e no metabolismo hepático de lipídios da prole de camundongos com 4 e 12 semanas de vida.

2.2. Objetivos Específicos

Primeira fase experimental:

Prole macho com 12 semanas de vida- CAPÍTULO I

- ✓ Avaliar ganho de peso e ingestão;
- ✓ Avaliar a tolerância à glicose através do teste de tolerância via intraperitoneal;
- ✓ Dosar níveis séricos de glicose, insulina, triglicérides, TNF α e IL1 β ;
- ✓ Caracterizar histologicamente o acúmulo lipídico hepático;
- ✓ Avaliar a expressão e/ou fosforilação de proteínas hepáticas relacionadas à adipogênese: FAS e ACC basal;
- ✓ Avaliar a fosforilação da HSL no tecido adiposo;
- ✓ Avaliar a expressão e fosforilação das proteínas relacionadas a sinalização da insulina no fígado e hipotálamo: IR, IRS1 IRS2 (imunoprecipitação) e AKT;
- ✓ Avaliar a atividade hepática das serina quinases JNK e IKK.
- ✓ Avaliar a expressão hepática da proteína PEPCK.

Segunda fase experimental:

Prole macho e fêmea com 4 semanas de vida- CAPÍTULO II

- ✓ Avaliar o peso ao nascer e o ganho de peso corpóreo;
- ✓ Avaliar a tolerância à glicose através do teste de tolerância via intraperitoneal;
- ✓ Avaliar a expressão de proteínas relacionadas à adipogênese e balanço energético FAS (fígado), AMPK (hipotálamo) e ACC (fígado e hipotálamo);
- ✓ Avaliar a responsividade hipotalâmica ao estímulo intraperitoneal de insulina pela análise da fosforilação da proteína AKT;
- ✓ Avaliar o perfil inflamatório pela análise da fosforilação das proteínas IKK (hepática) e JNK (hepática e hipotalâmica) e a quantidade de NFkB livre no fígado e hipotálamo.

3. METODOLOGIA

3.1. Animais experimentais

Foram utilizados para os experimentos camundongos *Mus musculus* (fêmeas) da linhagem *Swiss* cedidos pelo Biotério da Universidade Braz Cubas e pelo Cemib- Unicamp, com aproximadamente 6 semanas de idade. Os animais foram separados em 2 grupos: grupo a ser tratado com dieta padrão e grupo a ser tratado com dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação. As proles dos grupos NN (dieta padrão pré e pós natal) e HN (dieta hiperlipídica pré natal e durante a lactação e dieta padrão pós desmame) foram restritas a 5 animais (de ambos os sexos) por fêmea. Durante o período de tratamento, os animais foram mantidos em biotério em gaiolas coletivas com acesso a água e ração *ad libitum* e ciclo de luz (claro/escuro) de 12 horas.

3.2. Anestesia

Para a realização dos experimentos em que a sedação fez-se necessária, os camundongos foram anestesiados com uma mistura de Quetamina de Sódio (0,1g/Kg) e Diazepam (9 mg/Kg) por via intraperitoneal. Para certificar o efeito do anestésico foi avaliado o reflexo pedal dos animais.

3.3. Teste de tolerância à glicose (GTTip)

Para avaliar a tolerância à glicose foram utilizados 5 animais/grupo e jejum prévio de 14 horas. O sangue foi coletado a partir de um corte na cauda e a medida dos níveis de glicose foi realizada com aparelho Accu Check (Roche). Após a determinação da glicemia basal, uma solução de glicose 25 % (1g/kg) foi administrada por via intraperitoneal e novas medições de glicemia foram aferidas nos tempos de 15, 30, 60 e 120

minutos após a administração da glicose. Durante todo experimento os animais permaneceram conscientes.

3.4. Procedimento para extração de tecidos para análise pelo método de *Western Blot*

Para a extração dos tecidos de interesse, os animais foram mantidos em jejum noturno de 14 horas. A extração dos tecidos será realizada no início da manhã, após anestesia do animal, como descrito anteriormente.

Os animais serão pesados e separados entre animais que receberiam estimulação por insulina (+) e animais que não seriam estimulados (-). Os animais que não seriam estimulados foram anestesiados e um fragmento do tecido hepático e adiposo e o hipotálamo foram retirados e homogeneizados em tampão de extração com auxílio de um homogeneizador Politron® na velocidade de 25.000 r.p.m, por aproximadamente 20 segundos. Os animais NN e HN que seriam estimulados receberam uma injeção de insulina (0,08U/Kg) intraperitonealmente após a anestesia. Um fragmento de tecido hepático foi coletado 4 minutos após a injeção e o hipotálamo, 7 minutos após a injeção. O procedimento com os tecidos seguiu o mesmo protocolo descrito para os animais não estimulados. Ao final da extração e homogeneização dos fragmentos de tecidos, foi adicionado Triton X-100 a 1 % ao extrato. Após a adição do Triton as amostras foram mantidas em repouso no gelo pelo tempo mínimo de 40 minutos. Posteriormente, as amostras foram submetidas à centrifugação, com velocidade de 11000 r.p.m. por 20 minutos, a 4°C, para a remoção do material insolúvel, e somente o sobrenadante foi utilizado para o ensaio. Parte deste foi utilizado para dosagem do conteúdo protéico total pelo método colorimétrico de Biureto e parte foi estocada (Biofreezer a -80°C) em tampão *Laemmli* acrescido de 100 mmol/l de DDT para ensaios posteriores.

3.5. Western Blot

As amostras estocadas foram aquecidas a 95°C por 5 minutos e aplicadas (100 a 200µg de proteínas totais) em gel de poliacrilamida na concentração de 6% a 12%, de acordo com o peso molecular da proteína de interesse. A eletroforese foi realizada em aparelho BIO RAD® com a voltagem elevando-se gradualmente de 30 a 120V durante a corrida. Após a eletroforese, o material contido no gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose, com auxílio de um sistema de transferência da BIO RAD® a 120V durante 120 minutos. Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com uma solução de leite em pó desnatado Molico® a 5% em solução basal (10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, 0,02% Tween 20) durante 2 horas, com agitação leve e constante para reduzir a marcação inespecífica de proteínas.

A detecção das proteínas na membrana foi realizada através de reação com anticorpo específico adquiridos das empresas Santa Cruz Biotechnology® e Cell Signaling®. Para isso, as membranas foram incubadas durante o período mínimo 12 horas (4°C) em 10 ml de solução de anticorpo contendo albumina 3% em solução basal. Após a incubação com os anticorpos de interesse as membranas foram lavadas com a solução basal (6 vezes durante 5 minutos). Uma solução de anticorpo secundário conjugado com peroxidase (Sigma Aldrich®) foi preparada contendo 0,3 g de leite em pó desnatado Molico® e 10 ml de solução Basal. As membranas foram incubadas com esta solução durante período mínimo de 2 horas à temperatura ambiente e com agitação constante. Após este processo, as membranas foram novamente lavadas com a solução basal (6 vezes durante 5 minutos) e incubadas com luminol (Thermo Scientific®) para posterior detecção em câmara escura com filme de raio X Kodak®.

3.6. Forma de análise dos resultados

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM. A análise dos resultados foi realizada empregando-se a análise de variância de uma via (ANOVA), com nível crítico igual ou menor que 0,05, com teste a posteriori de Tukey para comparação entre 3 ou mais grupos. Foi realizado o teste t de Student não pareado para a comparação entre 2 grupos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

CAPÍTULO I

Primeira fase experimental

Artigo:

“Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver”

Publicado pela revista *The journal of Nutritional Biochemistry* volume 23, páginas 341-348 (2012).

Abstract

The exposure to an increased supply of nutrients before birth may contribute to offspring obesity. Offspring from obese dams that chronically consume a high-fat diet present metabolic syndrome features, liver lipid accumulation, and activation of c-Jun N-terminal kinases (JNK) consistent with the development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). However, in spite of the importance of the resistance to insulin for the development of NAFLD, the molecular alterations in the liver of adult offspring of obese dams have not been investigated yet. In this study, we tested the hypothesis that the consumption of excess saturated fats during pregnancy and lactation contributes to adult hepatic metabolic dysfunction in offspring. Adult male offspring of dams fed a high-fat diet (HFD) (HN) during pregnancy and lactation exhibited increased fat depot weight, increased serum insulin, TNF α , IL1 β , and reduced serum triglycerides. Liver showed increased JNK and IKK phosphorylation, PEPCK expression, and triglycerides content. Additionally, basal ACC phosphorylation and insulin signaling were reduced in the liver from the HN group as compared to offspring of dams fed a standard laboratory chow (NN). Hormone-sensitive lipase (HSL) phosphorylation (Ser565) was reduced in epididymal adipose tissue from the HN group as compared to the NN group. It is interesting that all alterations were independent of post-weaning diet in 14-week old offspring. Therefore, these data further reinforce the importance of maternal nutrition to adult offspring health.

Introduction

The prevalence of childhood obesity has increased dramatically around the world and studies have shown that exposure to an increased supply of nutrients before birth may contribute to overweight or obesity in later life [1, 2]. Several studies in animal models support the role of altered nutritional condition during pregnancy and the early postnatal period in predisposing offspring to the development of metabolic disorders [3-6]. In the model of diet-induced obesity, high fat consumption during pregnancy induced features of metabolic syndrome in adult offspring, independent of adult environmental factors [7]. Thus, the fetus responds to nutritional stress by 'programming' its own growth in a way that can lead to an increased risk of future metabolic disorders, such as insulin resistance, increased body fat mass, and reduced hypophagic effect of central insulin in later life [8].

The consumption of a high fat diet (HFD) during pregnancy may alter the development of peptide systems in the uterus, producing neuronal changes in the offspring that persist postnatally in the absence of the diet and that have long-term consequences [9]. Interestingly, the offspring of dams on an HFD showed increased expression of orexigenic peptides, galanin, enkephalin, and dynorphin in the paraventricular nucleus and orexin, and melanin-concentrating hormone in the perifornical lateral hypothalamus [10]. In an elegant study performed with Japanese macaques, McCurdy and colleagues showed that fetal offspring from both lean and obese mothers who chronically consumed an HFD had a three-fold increase in liver triglycerides and exhibited elevated hepatic expression of gluconeogenic enzymes. In addition, fetal offspring from HFD-fed mothers showed increased evidence of hepatic oxidative stress early in the third trimester, lipid accumulation, and activation of the c-Jun N-terminal kinases (JNK) in the fetal liver consistent with the development of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) [6].

According to the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD), NAFLD is defined as fat accumulation in the liver exceeding 5% to 10% by weight. NAFLD is perhaps the most common liver disease in the western hemisphere. Insulin resistance is central to the pathogenesis of the metabolic syndrome, and recent data indicate that NAFLD should be considered as the hepatic manifestation of the metabolic syndrome [11].

Obesity and type 2 diabetes are associated with a state of abnormal inflammatory response. Charlier and colleagues showed that obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta [12]. This inflammatory environment in which the fetus develops may have critical consequences for the short and long-term programming of obesity. Several downstream mediators and signaling pathways that provide the crosstalk between inflammatory and metabolic signaling have been identified (for review [13, 14]). Cytokines and FFAs are potent JNK and I kappa B kinase (IKK) activators and are key components in the pathogenesis of insulin resistance and the metabolic syndrome [15].

Studies performed with molecularly characterized forms of insulin resistance in humans suggest that partial postreceptor hepatic insulin resistance is a key element in the development of metabolic dyslipidemia, and hepatic steatosis [16]. In the present study, we investigated the effects of *in utero* and lactation high-fat diet exposure on the development of insulin resistance and hepatic steatosis in mice. We identified reduced insulin signaling, lipid accumulation, and activation of the JNK and IKKbeta in the liver of adult offspring.

2. Material and Methods

2.1. Animals and diets

The experiment was carried out according to the COBEA (Brazilian College of Animal Experimentation) guidelines, which are adopted by the Universidade Braz Cubas, Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil. Ten virgin female Swiss mice (70 days old) were taken from the University's Central breeding colony. Mating was performed by housing females with adult males overnight and pregnancy was confirmed by examining vaginal smears for the presence of sperm. Pregnant and virgin females were separated and maintained in individual polypropylene cages in a room at $24 \pm 1^{\circ}\text{C}$ with lights on from 6:00 to 18:00 h. They were fed diets and water *ad libitum* during the pregnancy and lactation periods. During the experimental period, the animals received two types of isocaloric diets: standard laboratory chow (control diet-CD) or experimental high fat diet (HFD) (Table I). The offspring were divided into two groups according to maternal feeding: offspring from female mice fed HFD (group HN) and offspring from female mice fed CD (group NN). On d1 after birth, the litters of both groups (HN and NN) were assigned to mixed-gender groups of five animals of similar body weight. The pups were weaned on d21 and separated according to sex. All pups were fed standard chow from weaning and throughout the experimental period.

2.2. Sample collection and analysis

At the end of the experimental period (82 days) and after overnight fasting, all mice were sacrificed and blood samples were collected, centrifuged, and serum aliquots were used to measure serum glucose by enzymatic colorimetry (glucose oxidase method) as described by

Trinder (25). Serum aliquots were stored at -80°C for hormone measurements. Serum insulin and TNF α were determined by ELISA using Kits Crystal Chem. Inc., USA and SABiosciences, USA, respectively. Serum triglyceride was determined using a specific kit. The epididymal fat pad was removed and measured to determine the fresh weight (g/g of body weight).

2.3. Evaluation of liver histology and triglyceride content.

Frozen tissues (200 mg) from HN and NN specimens were homogenized in 1.5 mL of PBS. The protein concentration of homogenate was determined and an aliquot of 300 μ L was extracted with 5 mL of chloroform/methanol (2:1) and 0.5 mL of 0.1% sulfuric acid. An aliquot of organic phase was collected, dried under nitrogen, and resuspended in 2% Triton X-100 [17, 18]. Triglyceride content was determined using a commercially available kit. Fragments of liver from NN and HN animals were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Serial sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) and observed in light microscopy.

2.4. Immunoprecipitation and immunoblotting

Briefly, mice were treated according to the protocols described in the preceding section. They were then anesthetized and subjected to tissue extraction. Tissues were obtained and homogenized in freshly prepared ice-cold buffer (1% Triton X-100, 100 mM Tris, pH 7.4, 100 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride, 10 mM EDTA, 10 mM sodium vanadate, 2 mM PMSF, and 0.01 mg aprotinin/mL). Insoluble material was removed by centrifugation (10,000 g) for 25 min at 4 °C. Aliquots of the resulting supernatants

containing 1.0 mg of total protein were used for immunoprecipitation with antibodies against IR, IRS1, and IRS2 at 4 °C overnight, followed by SDS-PAGE, transfer to nitrocellulose membranes, and blotting with anti-Py (phosphotyrosine). For direct immunoblot analyses, 0.2 mg protein from the extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and blotted with specific antibodies against AKT, GAPDH, FAS, PEPCK, p-HSL_{ser3}, and p-JNK. The proteins were detected by enhanced chemiluminescence. The results were visualized by autoradiography with preflashed Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software, ScionCorp).

2.5. Data presentation and statistical analysis

All numerical results are expressed as means $\pm$ SD of the indicated number of experiments. Blot results are presented as direct band comparisons in autoradiographs and quantified by densitometry using the Scion Image software (ScionCorp). t-Student tests of unpaired samples and variance analysis (ANOVA) for multiple comparisons were used as appropriate. Post hoc test (Tukey) was employed when required. The level of significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Body weight, food intake, and adiposity

The pups were weighed on d2 and weekly thereafter. The body weight of HN animals was higher than NN from d2 (Fig.1A) to d82 (Fig.1B). In d82, the epididymal fat pad was weighed; HN animals showed a fat mass larger than NN (0.77 ± 0.01 in HN offspring vs.

0.4 ± 0.01 g in NN) (Fig. 1C). No differences in food intake were observed between the NN and HN offspring (data not shown).

3.2. Liver lipid content and histological analysis.

The liver presented yellowish appearance (data not shown) and the quantitative determination revealed that the content of hepatic triglycerides increased about 1.4-fold in HN mice as compared with the NN group (Fig. 2A). In addition, the analysis of HE-stained liver sections showed that the HN group presented large lipid vacuoles within hepatocytes, while the NN group had normal liver structure, without lipid vacuoles (Fig. 2B).

3.3. Plasma Analyses

There were no significant differences in lipid profiles or plasma glucose between HN and NN offspring. The levels of fasting insulin and TNF α were higher in HN than in NN animals (Table II).

3.4. Expression and activation of proteins of insulin signaling in the liver.

Initially, we examined whether the offspring of dams fed an HFD during gestation and lactation presented changes in the protein of the insulin-signaling pathway in liver tissue. The expression of total IR, IRS1, and AKT was not different between the groups at d82 (Fig. 3). However, HN presented reduced phosphorylation of the insulin signaling components as compared to the NN group (Fig. 4). As expected, the caval administration of insulin induced tyrosine phosphorylation of the insulin receptor (2.4-fold) (Fig. 4A), as well as IRS-1 (2.1-fold) (Fig. 4B) and IRS-2 (2.6-fold) (Fig. 4C) when compared to saline-

treated controls. Moreover, serine phosphorylation of PKB/AKT also increased (6.7-fold) after insulin administration (Fig. 4D) when compared with the vehicle. However, in the HN group, the effect of insulin was significantly reduced. The phosphorylation of IR, IRS1, IRS2, and AKT were increased by 1.6-fold, 1.5-fold, 1.8-fold, and 3.1-fold, respectively, when compared to the saline-treated control.

3.5. Liver p-ACC, FAS, and PEPCK expression.

Total FAS expression in the liver of the NN and HN animals was evaluated. The expression of FAS was higher in the group NN than the HN group (1.4-fold) (Fig 5A). The basal p-ACC level was reduced (3.3-fold) in HN when compared to NN (Fig.5B). On the other hand, PEPCK expression increased in the group HN by about 35% when compared to the NN group (Fig.5C).

3.6. JNK, IKK and HSL phosphorylation.

Basal JNK and IKK phosphorylation in liver tissue of the NN and HN groups were evaluated. Compared to saline-treated controls, basal phosphorylation of JNK and IKK in the liver from HN mice increased (3.2-fold and 2.3-fold, respectively) as compared to NN mice (Fig. 6A and B).

Basal hormone-sensitive lipase (HSL) phosphorylation (SER₄₆₃) was evaluated in the epididymal fat pad of NN and HN animals. The basal phosphorylation of HSL of HN animals was reduced 1.8-fold as compared to the NN group (Fig. 6C).

4. Discussion

It is well established that maternal diet during gestation and lactation influences fetal and postnatal development. Prenatal and suckling exposure to a diet rich in animal fat leads to excessive body weight, insulin resistance, pancreatic β -cell dysfunction, and the development of a metabolic syndrome-like phenotype in adult life [19-21].

Insulin resistance is central to the pathogenesis of the metabolic syndrome, and recent data indicate that NAFLD should be considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome [11]. In our study model, the adult offspring did not develop glucose intolerance, as evaluated by GTT (data not shown). In addition, fasting glucose was not different between HN and NN mice. However, the body weight at birth and adiposity were higher in HN than NN animals. The corporal weight gain was larger in the HN group up to d82. Although we did not measure maternal glucose and insulin levels throughout pregnancy in the present study, the increased birth weight suggests that it is likely due to the development of gestational diabetes. These findings indicate potential programming effects of an altered intrauterine environment induced by the consumption of an HFD. The hypothalamus plays a central role in energy homeostasis by both regulating appetite and energy expenditure. In the present study, we did not evaluate the fetal hypothalamic alterations in HN mice. However, Gupta and colleagues [22] showed that fetuses of female rats fed an HFD had significantly increased expression of both leptin and insulin receptor, and serum leptin and insulin levels. Furthermore, young adults exposed early (intrauterine/perinatal) to hydrogenated fat rich in trans fatty acids showed loss of insulin-induced hypophagia [8], indicating that the mismatch between early and late nutritional environments was relevant. Therefore, the maternal and fetal environments during

pregnancy and obesity in rats fed an HFD may contribute to metabolic syndrome-like phenotype in adult life.

Interestingly, although insulin resistance was not observed through GTT, HN mice presented lipid vacuoles in liver cells, indicating an imbalance in triglyceride formation and turnover, a characteristic of NAFLD. Insulin resistance seems to be an essential requirement for the development of NAFLD. It contributes to NAFLD by altering TG synthesis and transport, increasing the lipolysis rate in the adipose tissue and the transport of free fatty acids to the liver [23]. *De novo* lipogenesis contributes significantly to hepatic accumulation of TG in NAFLD [24] and, in this condition, the amounts of enzymes of the fatty acid biosynthesis pathway may be increased. Interestingly, the HN group presented reduced expression of FAS and smaller phosphorylation of ACC than the NN group, corroborating the data that showed an increase in the lipid content in the liver of HN mice. ACC is a multifunctional enzyme that catalyses the conversion of acetyl-CoA to malonyl-CoA, a precursor of lipid synthesis pathway when activated (dephosphorylated form). Additionally, malonyl-CoA is a potent inhibitor of carnitine palmitoyl transferase-1 (CPT1), a rate-limiting step for the entry of long chain fatty acids (LCFA) into the mitochondria for oxidation [25]. Therefore, the inhibition of oxidation, rather than the stimulation of synthesis, may have contributed to lipid accumulation in the liver. Recently, in an interestingly study Bruce and colleagues investigated this hypothesis and concluded that maternal fat intake contributes toward the NAFLD progression in adult offspring, which is mediated through impaired hepatic mitochondrial metabolism and up-regulated hepatic lipogenesis [26].

In spite of several studies that describe a broad range of metabolic abnormalities presented by offspring of HFD-fed dams during gestation and lactation [5-7, 10, 19, 27],

the presence of triglycerides in the liver of adult offspring of HFD-fed dams was demonstrated by some studies [19, 20, 28]. Recently, in an elegant study with nonhuman primates, McCurdy and colleagues suggested that the increased level of liver triglycerides in offspring of HFD-fed dams resulted from maternal lipid transfer, because there was no change in either mRNA or protein expression of any of the lipogenic enzymes. Although maternal lipid transfer may have contributed to fetal NAFLD, this possibility was discarded in our study, as the offspring were 12 weeks old. However, maternal lipid transfer may be associated with permanent metabolic changes in fetal liver that increase the risk of steatosis during fetal development, such as reduced TG export and decreased FA oxidation. It is possible that the liver from adult offspring presents diminished fatty acid oxidation, as indicated by reduced ACC phosphorylation in the HN group. As discussed above, dephosphorylated ACC is active and produces malonyl-CoA, an inhibitor of fatty acid oxidation. We acknowledge limitations in the evaluation of the p-ACC level; however, these animals also presented reduced phosphorylation of HSL_{ser398} in the adipose tissue and a higher level of serum free fatty acids when compared to the NN group, indicating that the flux of fatty acids to the liver increased. All together, these results may at least partially explain liver lipid accumulation and the ensuing NAFLD and insulin resistance.

To investigate insulin resistance, we evaluated insulin-induced phosphorylation of liver IR, IRS, and AKT proteins. Although insulin resistance was not observed through the insulin or glucose tolerance tests, the animals of the HN group presented lesser insulin-induced phosphorylation of liver IR, IRS, and AKT as compared to NN animals. Thus, the liver of the offspring of dams fed an HFD in pregnancy presents molecular resistance to insulin, which may contribute to hepatic steatosis. Insulin resistance is an important event that may precede triglyceride accumulation in the liver [11, 23]. The conventional

explanation for hepatic triglyceride accumulation is that visceral obesity and insulin resistance, mostly mediated by adipokines, such as $\text{TNF-}\alpha$, result in increased FFA release from adipocytes with the consequent enhanced delivery of lipids to the liver. Additionally, the reduced capacity of insulin to inhibit the production of hepatic glucose aggravates the peripheral insulin resistance and contributes to hepatic lipogenesis [23].

The pathogenesis of insulin resistance has the activation of serine kinases as a key event. The offspring of HFD-fed dams (HN group) showed increased basal phosphorylation of liver IKK and JNK and higher levels of serum $\text{IL1}\beta$ and $\text{TNF}\alpha$ when compared to the offspring of dams fed chow (group NN). The concentration of serum free fatty acids also increased in HN when compared to the NN group. In an animal model of diet-induced fatty liver disease, the increase in the expression of inflammatory cytokines contributed to worsen insulin signaling and activation of gluconeogenic and lipidogenic pathways [29]. Cytokines are potent JNK and IKK activators, two serine kinases that may contribute to the deregulation of the insulin-signaling pathway [30-32]. Thus, we believe that two mechanisms may contribute to lipid accumulation in the liver. Initially, it is likely that the exposure to a dysmetabolic condition in the uterine environment induced by HFD consumption alters the leptin and insulin signaling in the late fetal period. Gupta and colleagues have demonstrated potential programming effects of an altered intrauterine environment on appetite-regulating neuropeptides and leptin and insulin signaling in the late fetal period [22]. Damage to the hypothalamic insulin and leptin signaling pathways may cause hyperphagia and reduced energy expenditure, leading to increased adiposity and excessive body weight in adult life, as observed in the offspring of fat-fed dams (HN group at d82). Besides, the prolonged release of abnormally high levels of leptin by neonatal rats

leads to leptin resistance and permanently affects hypothalamic functions involving the ARC and PVH [9].

The contribution of the uterine environment to obesity and metabolic syndrome in adult mice is not yet completely known. In rodent models, maternal HF feeding has been reported to have variable effects on metabolic changes in offspring. These discrepancies are likely due to differences in fatty acid composition of fat-enriched diets across studies and varying levels of maternal intake of saturated fat [33-35]. Caluwaerts and colleagues showed that overweight, adipocyte hypertrophy, and increased TNF- α gene expression in white adipose tissue (WAT) were observed from early life to d35, but not in postpubertal rats [27]. On the other hand, offspring of fat-fed dams presented impaired glucose homeostasis and mitochondrial abnormalities in 3-9-month-old and 1-year-old mice [21] and hyperinsulinaemia and hyperleptinaemia [33].

Our study showed that the offspring presented liver lipid deposition at d82, as well as molecular insulin resistance and excessive body weight. In addition, serum insulin, TNF α and IL1 β , and liver p-JNK and p-IKK were higher in HN animals. Taken together, these results reinforce the importance of maternal nutrition during these critical windows of development and suggest that consumption of an HFD by the mother predisposes the offspring to develop a metabolic syndrome-like phenotype in adult life independent of postnatal nutrition.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP and CNPq. We thank Mr. Laerte J. Silva for the English language editing.

References

- [1] Silverman BL, Rizzo TA, Cho NH, Metzger BE. Long-term effects of the intrauterine environment. The Northwestern University Diabetes in Pregnancy Center. *Diabetes Care*. 1998;21 Suppl 2:B142-9.
- [2] Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, Rohde W, Dörner G. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol*. 1999;11:541-6.
- [3] Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, Pandya JD, Patel MS. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291:E792-9.
- [4] Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *J Physiol*. 2005;565:3-8.
- [5] Armitage JA, Khan TY, Taylor PD, Nathanielsz PW, Poston L. Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance: how strong is the evidence from experimental models in mammals? *J Physiol*. 2004;561:355-77.

- [6] McCurdy CE, Bishop JM, Williams SM, Grayson BE, Smith MS, Friedman JE, Grove KL. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. *J Clin Invest*. 2009;119:323-35.
- [7] Chechi K, Cheema SK. Maternal diet rich in saturated fats has deleterious effects on plasma lipids of mice.
- [8] Albuquerque KT, Sardinha FL, Telles MM, Watanabe RL, Nascimento CM, Tavares do Carmo MG, Ribeiro EB.
- [9] Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamiananos T, Poston L, Taylor PD, Coen CW. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*. 2009;4:e5870.
- [10] Chang GQ, Gaysinskaya V, Karatayev O, Leibowitz SF. Maternal high-fat diet and fetal programming: increased proliferation of hypothalamic peptide-producing neurons that increase risk for overeating and obesity. *J Neurosci*. 2008;28:12107-19.
- [11] Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, Natale S, Vanni E, Villanova N, Melchionda N, Rizzetto M. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology*. 2003;37:917-23.
- [12] Challier JC, Basu S, Bintein T, Minnum J, Hotmire K, Catalano PM, Hauguel-de Mouzon S. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. *Placenta*. 2008;29:274-81.
- [13] Hotamisligil GS. Inflammatory pathways and insulin action. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003;27 Suppl 3:S53-5.
- [14] Hotamisligil GS. Role of endoplasmic reticulum stress and c-Jun NH2-terminal kinase pathways in inflammation and origin of obesity and diabetes. *Diabetes*. 2005;54 Suppl 2:S73-8.

- [15] De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, Saad MJ, Velloso LA. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146:4192-9.
- [16] Semple RK, Sleight A, Murgatroyd PR, Adams CA, Bluck L, Jackson S, Vottero A, Kanabar D, Chariton-Menys V, Durrington P, Soos MA, Carpenter TA, Lomas DJ, Cochran EK, Gordon P, O'Rahilly S, Savage DB. Postreceptor insulin resistance contributes to human dyslipidemia and hepatic steatosis. *J Clin Invest*. 2009;119:315-22.
- [17] Newberry EP, Xie Y, Kennedy S, Han X, Buhman KK, Luo J, Gross RW, Davidson NO. Decreased hepatic triglyceride accumulation and altered fatty acid uptake in mice with deletion of the liver fatty acid-binding protein gene. *J Biol Chem*. 2003;278:51664-72.
- [18] Carr TP, Andresen CJ, Rudel LL. Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts. *Clin Biochem*. 1993;26:39-42.
- [19] Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *Br J Nutr*. 2009;102:514-9.
- [20] Gao F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav*. 1995;57:681-6.
- [21] Taylor PD, McConnell J, Khan IY, Holemans K, Lawrence KM, Asare-Anane H, Persaud SJ, Jones PM, Petrie L, Hanson MA, Poston L. Impaired glucose homeostasis

- and mitochondrial abnormalities in offspring of rats fed a fat-rich diet in pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2005;288:R134-9.
- [22] Gupta A, Srinivasan M, Thamadilok S, Patel MS. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. *J Endocrinol*. 2009;200:293-300.
- [23] Bugianesi E, McCullough AJ, Marchesini G. Insulin resistance: a metabolic pathway to chronic liver disease. *Hepatology*. 2005;42:987-1000.
- [24] Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest*. 2005;115:1343-51.
- [25] Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*. 2002;30:1059-64.
- [26] Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC, Bateman AC, Clough GF, Poston L, Hanson MA, McConnell JM, Byrne CD. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology*. 2009.
- [27] Caluwaerts S, Lambin S, van Bree R, Peeters H, Vergote I, Verhaeghe J. Diet-induced obesity in gravid rats engenders early hyperadiposity in the offspring. *Metabolism*. 2007;56:1431-8.
- [28] Koukkou E, Ghosh P, Lowy C, Poston L. Offspring of normal and diabetic rats fed saturated fat in pregnancy demonstrate vascular dysfunction. *Circulation*. 1998;98:1899-904.

- [29] Cintra DE, Pauli JR, Arnujo EP, Moraes JC, de Souza CT, Milanski M, Morari J, Gambero A, Saad MJ, Velloso LA. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. *J Hepatol*. 2008;48:628-37.
- [30] Lee YH, Giraud J, Davis RJ, White MF. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *J Biol Chem*. 2003;278:2896-902.
- [31] Cai D, Yuan M, Frantz DF, Melendez PA, Hansen L, Lee J, Shoelson SE. Local and systemic insulin resistance resulting from hepatic activation of IKK-beta and NF-kappaB. *Nat Med*. 2005;11:183-90.
- [32] Arkan MC, Hevener AL, Greten FR, Maeda S, Li ZW, Long JM, Wynshaw-Boris A, Poli G, Olefsky J, Karin M. IKK-beta links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nat Med*. 2005;11:191-8.
- [33] Howie GJ, Sloboda DM, Kamal T, Vickers MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *J Physiol*. 2009;587:905-15.
- [34] Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH, Piersma AH, Ozanne SE, Twinn DF, Remacle C, Rowlerson A, Poston L, Taylor PD. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*. 2008;51:383-92.
- [35] Armitage JA, Poston L, Taylor PD. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: the role of maternal obesity. *Front Horm Res*. 2008;36:73-84.

LEGENDS

Fig. 1- Body parameters of NN and HN animals. (A) body weight at d3, (B) body mass evolution from d17 to d82 and (C) epididymal fat pad weight at d82. Data are means $\pm$ SD, n = 8-10. *HN vs. NN.

Fig. 2. Liver triglyceride content (A) and photomicrographs of liver stained with hematoxylin and eosin (B) from NN and HN animals. Data are means $\pm$ SD, n = 5. To (A) $p \leq 0.05$, *HN vs. NN.

Fig. 3- Expression of IR, IRS-1, and AKT protein in liver of NN and HN animals at d82. (A), immunoblotting (IB) with anti-IR; (B), IB with anti-IRS-1, and (C) IB with anti-AKT. Bars show quantification of total IR, IRS-1, and AKT normalized by total GAPDH in tissue. Data are means $\pm$ SD, n = 5. $p \leq 0.05$.

Fig. 4- Insulin signaling in liver of NN and HN animals at d82. (A), immunoprecipitation (IP) with anti-IR, and immunoblotting (IB) with anti-Py antibodies; (B), IP with anti-IRS-1, and IB with anti-pY; (C), IP with anti-IRS-2, and IB with anti-pY; (D), IB with anti-p-AKT. Mice subjected to an overnight fast received either saline (-) or insulin (+) (3 pmol) through the cava vein before liver excision. Bars show quantification of phosphorylated protein normalized by total protein in tissue. Data are means $\pm$ SD, n = 5. $p \leq 0.05$, *NN+ vs. NN, ** HN+ vs. NN+.

Fig. 5- Basal level of FAS (A), p-ACC (B) and PEPCK (C) in liver from NN and HN animals. (A), immunoblotting (IB) with anti-FAS antibodies; (B), IB with anti-p-ACC and

(C), IB with anti-PEPCK. Bars show quantification of total protein normalized by total GAPDH in tissue. Data are means $\pm$ SD, n = 5, $p \leq 0.05$, *HN vs. NN.

Fig. 6- Liver basal phosphorylation of JNK (A), IKK (B) and HSL₃₆₃ (C) in NN and HN groups. (A), immunoblotting (IB) with anti-p-JNK antibodies; (B), IB with anti-p-IKK and (C), IB with anti-p-HSL₃₆₃. Bars show quantification of total protein normalized by total GAPDH in tissue. Data are means $\pm$ SD, n = 5. $p \leq 0.05$, *HN vs. NN.

Table I

Table I-Nutritional composition of experimental diet and standard chow used during gestation and lactation.

Nutrients	Standard Chow	High fat diet
	g%	g%
Protein	20	20
Carbohydrate	66	43
Saturated Fat	4	23
Coline	0.25	0.25
Fiber	5	5
Vitamin	1	1
Mineral	3.5	3.5
Cystine	0.3	0.3
Energy (KJ/100g)	1591	1939
Calories from lipids (%/100 g of diet)	9	45

Table II

Table II- Postnatal serum biochemical parameters at d82 in offspring of HFD-fed dams (HN) and control (NN).

Parameters	Groups	
	NN	HN
Fasting serum glucose (mg.dl ⁻¹)	137 ± 23	161 ± 30
Fasting serum insulin (ng.ml ⁻¹)	0.8 ± 0.07	1.4 ± 0.1*
Serum TNF α (pg.ml ⁻¹)	85 ± 9.2	147 ± 18.4*
Serum IL1 β (pg.ml ⁻¹)	45 ± 7.0	85 ± 12.1*
Serum triglycerides (mg.dl ⁻¹)	170 ± 30	102 ± 25
Data are means ± S.E.M., n = 5–7 per group. * P ≤ 0.05 to NH vs. NN.		

Figure 1

Fig. 1

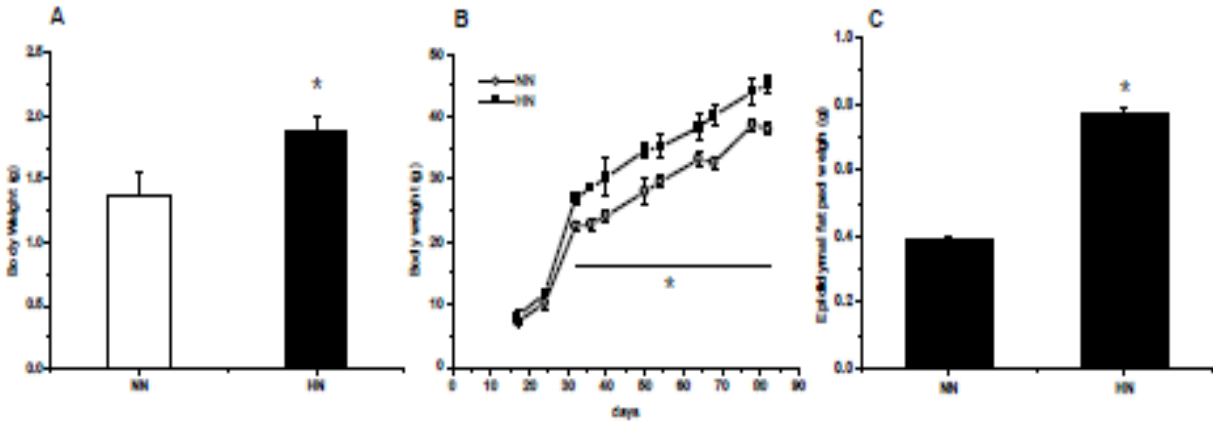


Figure 2

Fig.2

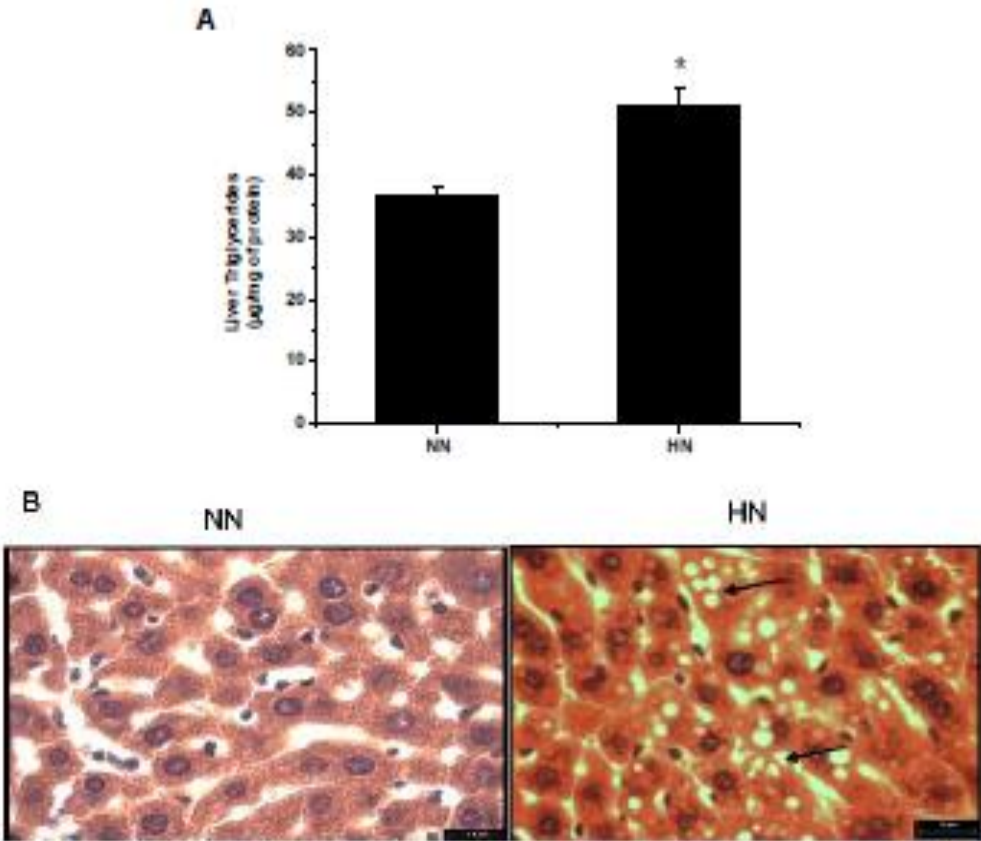


Fig.3



Figure 4

Fig.4

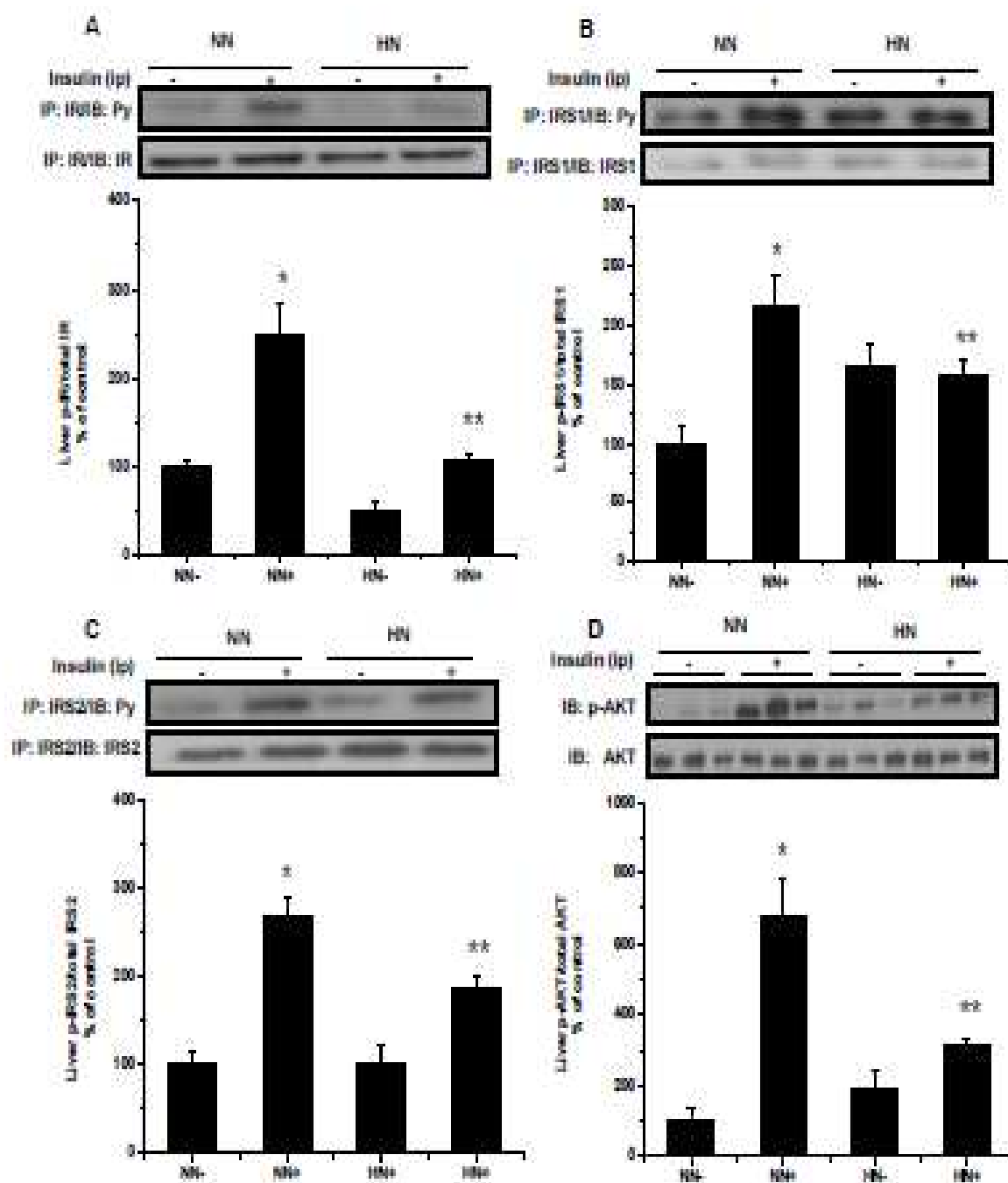


Figure 5

Fig.5

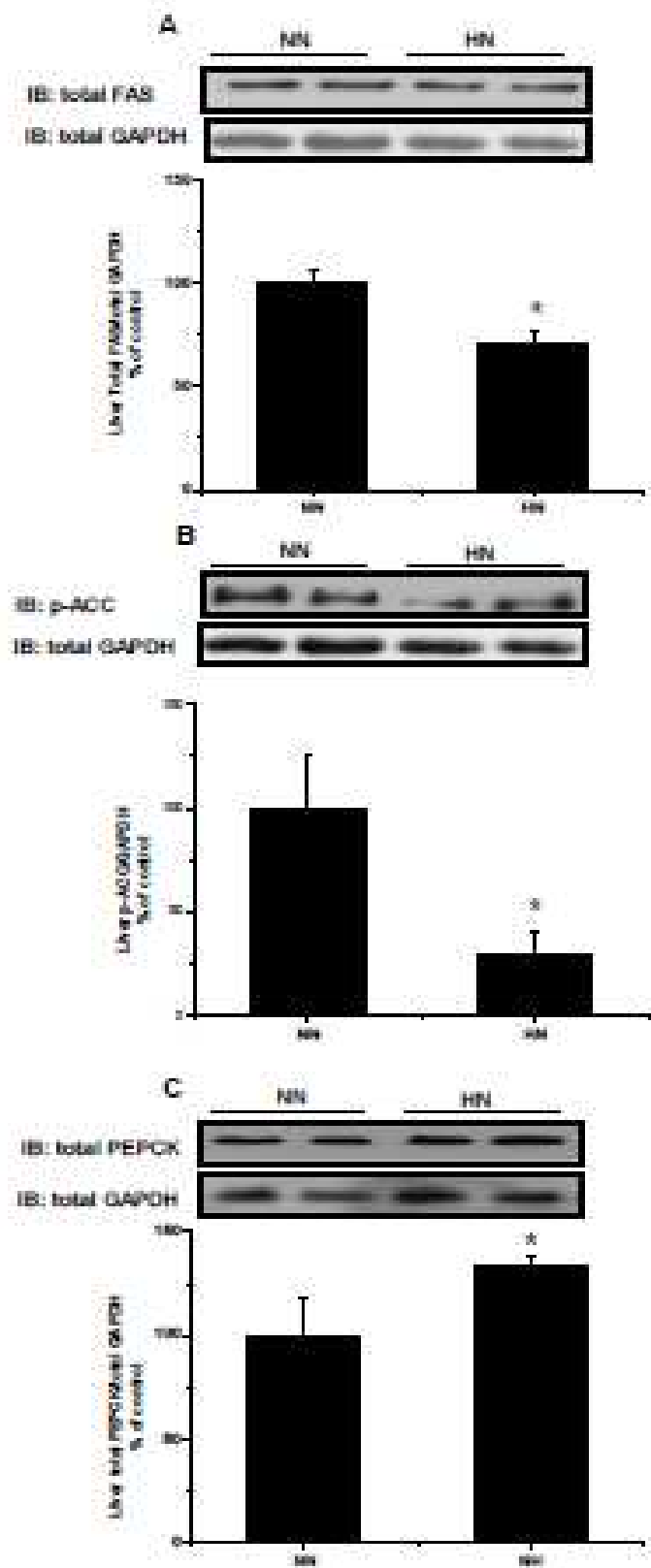
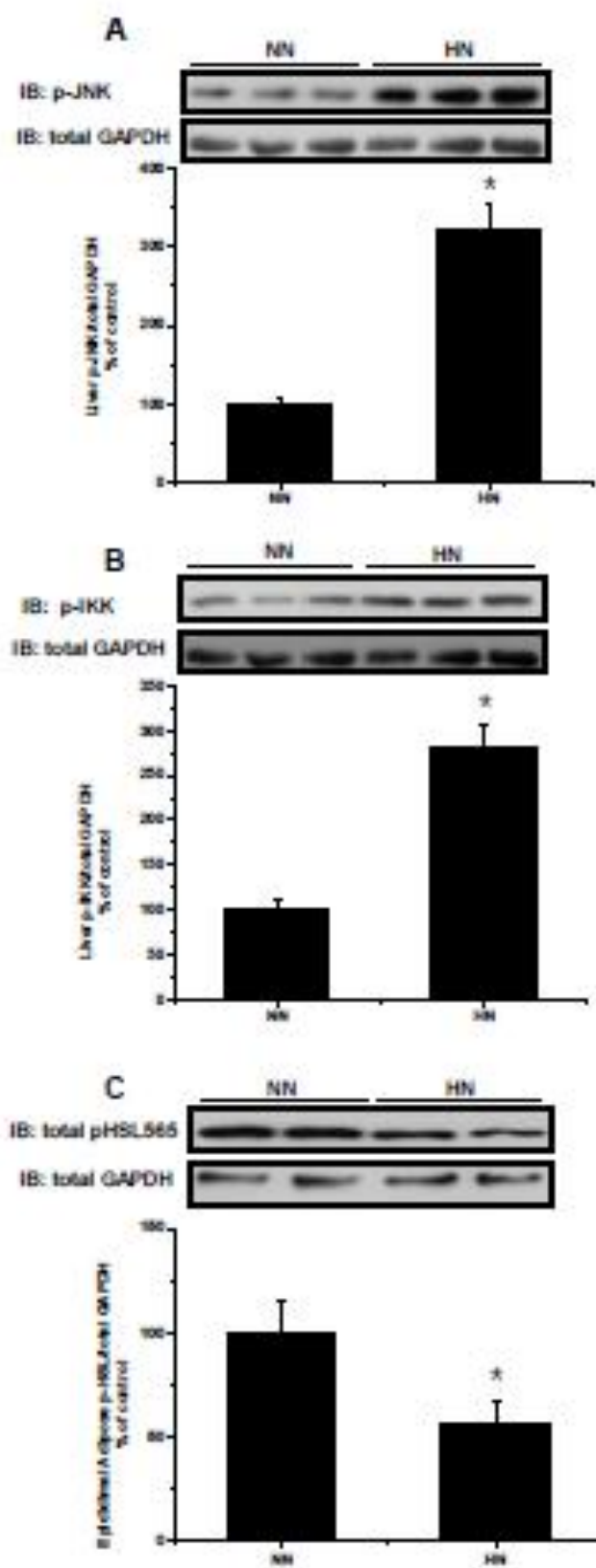


Figure 6

Fig.6



CAPÍTULO II

Segunda fase experimental

II.1. Tolerância à Glicose

O teste de tolerância à glicose mostrou diferenças consideráveis no perfil glicêmico dos grupos analisados (figura 1A). A curva glicêmica dos animais do grupo HN apresentou área média 74% superior à do grupo NN (figura 1B). Em adição, os animais do grupo HN apresentaram glicemia basal média 45% maior que o grupo NN ($82 \pm 1,14$ e $119 \pm 1,88$, respectivamente).

II.2. Análise da expressão e/ou fosforilação das proteínas JNK, NFkB e IKK

A avaliação da expressão ou fosforilação das proteínas da via pró-inflamatória nos animais dos grupos HN e NN foi realizada por *western blot*. No fígado dos animais do grupo HN a JNK apresentou-se 158% mais fosforilada (figura 2A) e no hipotálamo as isoformas JNK 1 e 2 apresentaram aumento de 158% e 55%, respectivamente. O conteúdo de NFkB (figuras 3A e 3B) foi 90% maior no fígado dos animais HN. De maneira similar no hipotálamo a expressão de NFkB foi 96% maior no grupo HN se comparado ao grupo NN. A proteína IKK também apresentou maior fosforilação no fígado (281%) dos animais do grupo HN (figura 4).

II.3. Avaliação da fosforilação da proteína AKT hipotalâmica

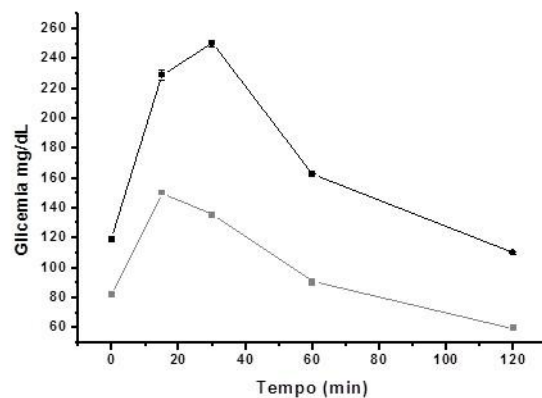
A ativação da proteína AKT foi utilizada como parâmetro para a avaliação da sensibilidade hipotalâmica à insulina. A figura 5 demonstra uma significativa diminuição da sensibilidade à insulina no hipotálamo dos animais do grupo HN.

II.4. Análise da expressão e/ou fosforilação das proteínas ACC, FAS e AMPK

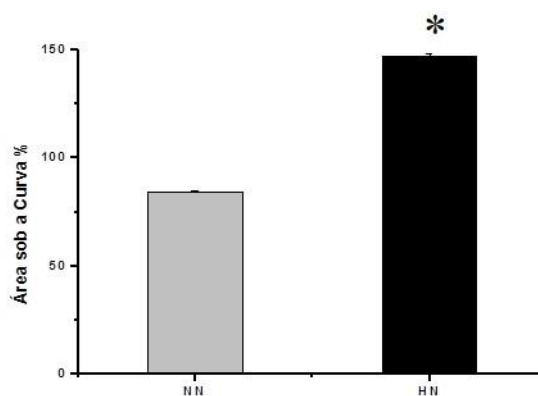
A proteína ACC apresentou-se no tecido hepático em maior quantidade e menor fosforilação basal (56% inferior a NN) nos animais do grupo HN (figura 6A). No hipotálamo a fosforilação da ACC não foi diferente entre os grupos, entretanto a quantidade da proteína ACC foi maior neste tecido. A proteína ácido graxo sintase (FAS) também mostrou-se aumentada em 132% no fígado dos animais do grupo HN (figura 7).

A proteína AMPK hipotalâmica nos animais do grupo HN apresentou menor desfosforilação após o desafio com insulina por via intraperitoneal se comparado ao grupo NN (figura 8).

A



B



C

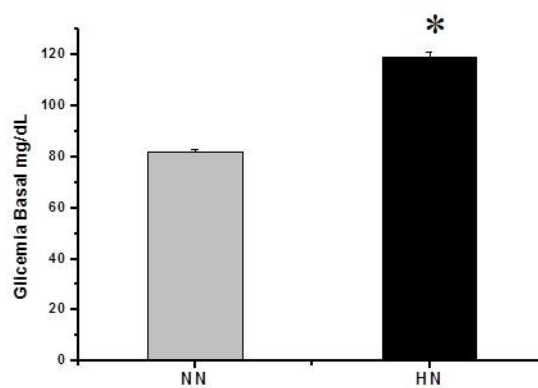


Figura 1: A- Curva de decaimento da glicemia sanguínea dos animais NN ● e NH ● com 4 semanas de vida após injeção intraperitoneal de glicose 25% (1g/Kg) pelo período de 0 a 120 minutos. B- Áreas sob as curvas NN ● e NH ●. C- Glicemia basal animais NN ● e NH ● com 4 semanas de vida. n=5 animais/ grupo, * $p \leq 0,05$ NNvsHN. Jejum noturno de 14 horas.

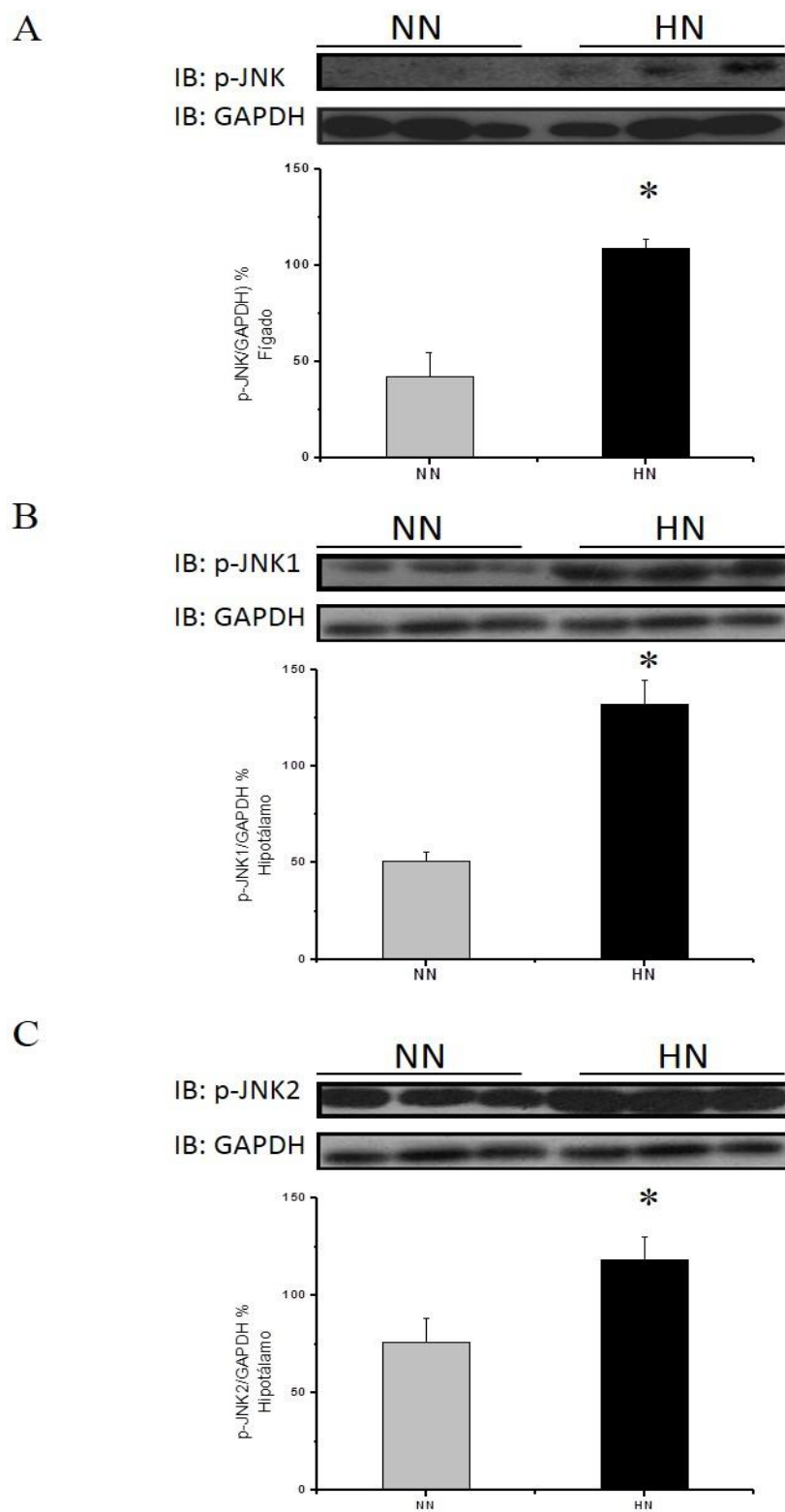


Figura 2: *Immunoblotting* da proteína JNK fosforilada no fígado (A); JNK 1 fosforilada no hipotálamo (B); JNK 2 fosforilada no hipotálamo (C). Dados normalizados pelo controle endógeno GAPDH. n=3 animais/ grupo, * $p \leq 0,05$ NN vs HN. Jejum noturno de 14 horas.

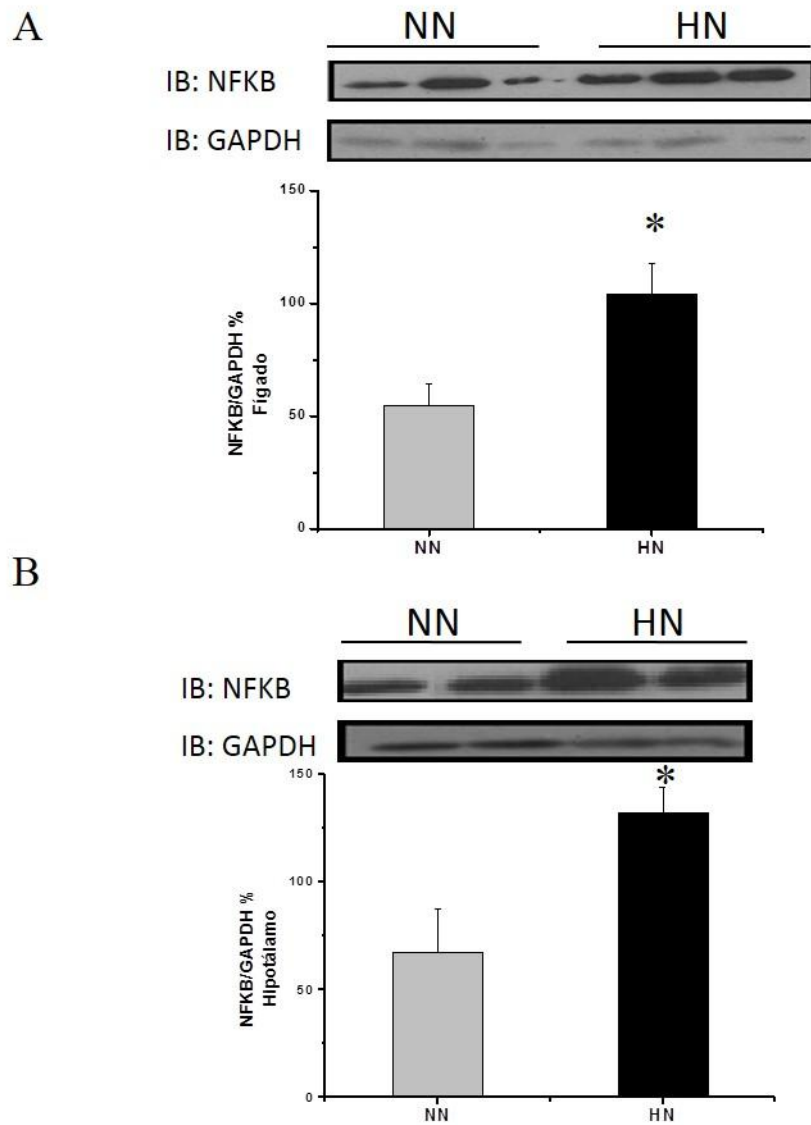


Figura 3: *Immunoblotting* da proteína NFKB nos tecidos hepático (A) e hipotalâmico (B). Dados normalizados pelo controle endógeno GAPDH. n=3 animais/ grupo, * $p \leq 0,05$ NNvsHN. Jejum noturno de 14 horas.

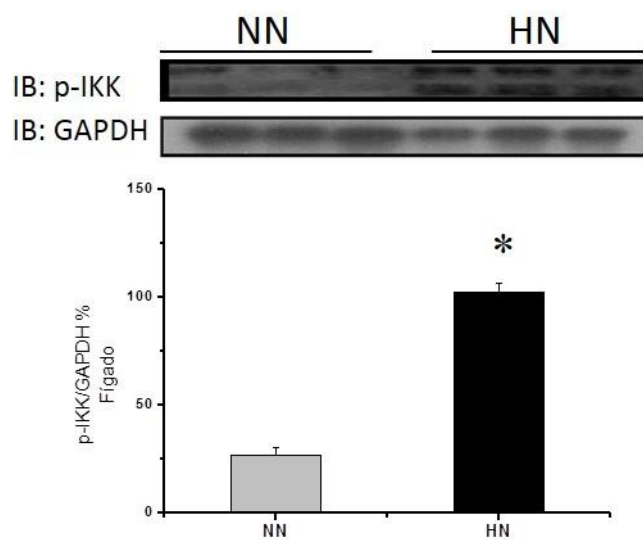


Figura 4: *Immuniblotting* da proteína IKK fosforilada no tecido hepático. Dado normalizado pelo controle endógeno GAPDH. n=3 animais/ grupo, * $p \leq 0,05$ NNvsHN Jejum noturno de 14 horas.

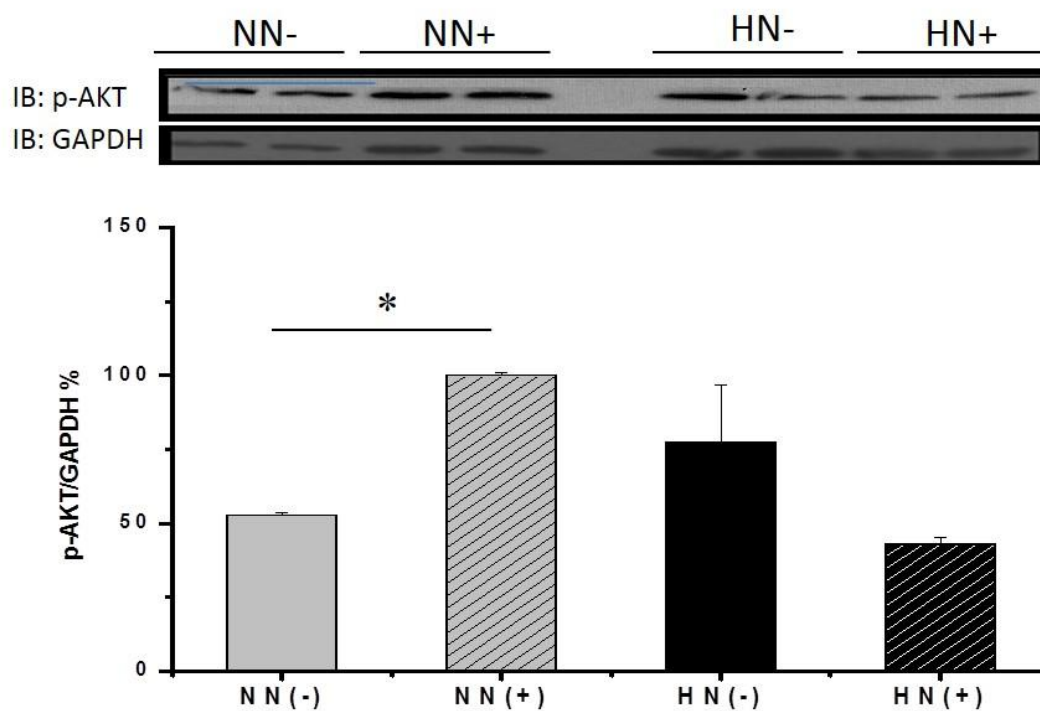


Figura 5: *Immunoblotting* da proteína AKT fosforilada hipotalâmica. Dado normalizado pelo controle endógeno GAPDH. (-)- sem estimulação, (+)- estimulação prévia (7 minutos) com insulina (0,08U/Kg) administrada via intraperitoneal. n=3 animais/ grupo (*blot* representativo), * $p \leq 0,05$ NN(+)*vs*HN(+). Jejum noturno de 14 horas.

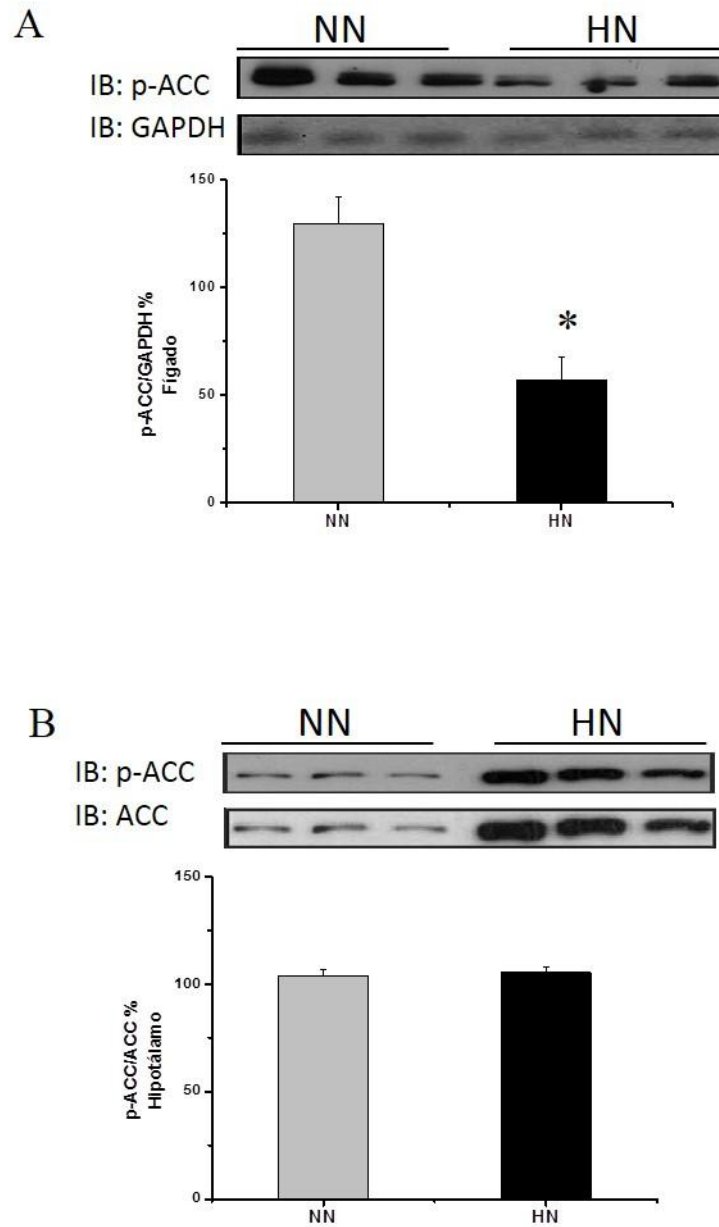


Figura 6: *Immunoblotting* da proteína ACC fosforilada: A- no tecido hepático. Dado normalizado pelo controle endógeno GAPDH. B- ACC fosforilada/ACC total no tecido hipotalâmico. n=3 animais/ grupo, * $p \leq 0,05$ NN vs HN. Jejum noturno de 14 horas.

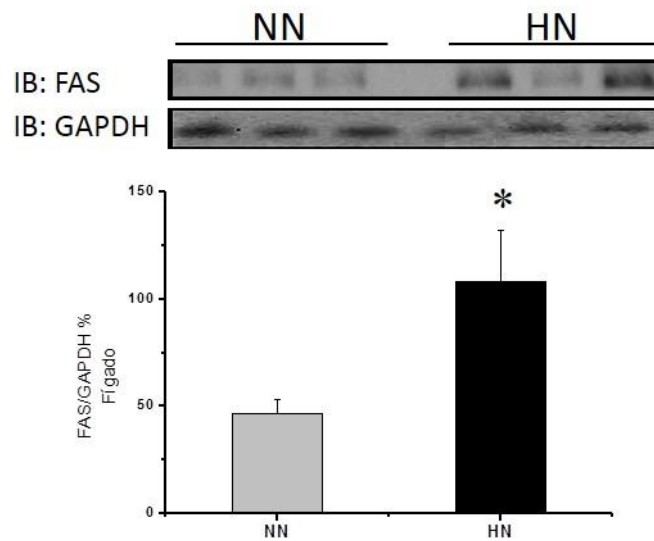


Figura 7: *Immunoblotting* da proteína FAS no tecido hepático. Dado normalizado pelo controle endógeno GAPDH. n=3 animais/ grupo, * $p \leq 0,05$ NN vs HN. Jejum noturno de 14 horas.

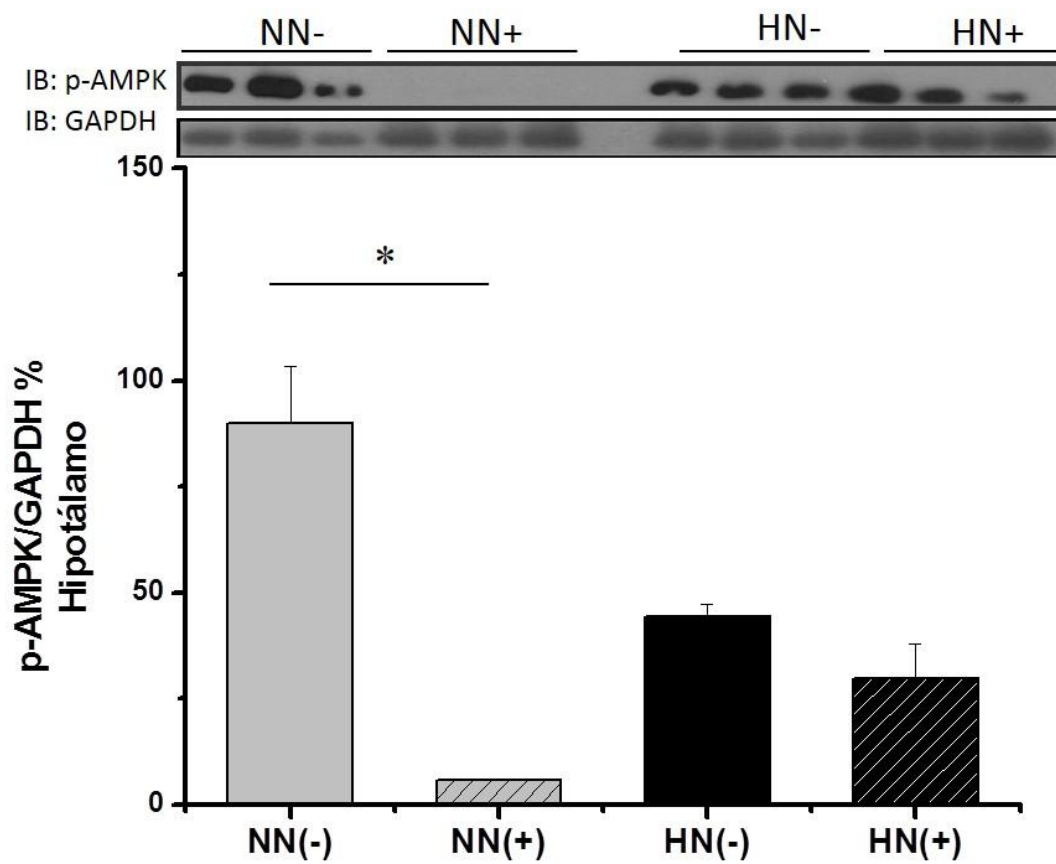


Figura 8: *Immunoblotting* da proteína AMPK fosforilada no tecido hipotalâmico. Dado normalizado pelo controle endógeno GAPDH. (-)- sem estimulação, (+)- estimulação prévia (7 minutos) com insulina (0,08U/Kg) administrada via intraperitoneal. n=3 animais/ grupo, * $p \leq 0,05$ NN(+)*vs*HN(+). Jejum noturno de 14 horas.

5. DISCUSSÃO

É conhecido que o consumo de dieta rica em gordura contribui de maneira importante para o desenvolvimento de intolerância a glicose, diabetes e obesidade (AGARDH; AHRÉN, 2012; MOLLER; KAUFMAN, 2005). Estudos recentes tem procurado investigar a contribuição do consumo materno de dieta rica em gordura para o desenvolvimento de patologias metabólicas na prole adulta (DRAKE *et al*, 2012; GREGÓRIO *et al*, 2012; KAPPEN *et al*, 2012). Em um estudo utilizando placentas foi descrito que características pró-inflamatórias, tais como a presença de macrófagos CD14+ e CD68+ e expressão das citocinas pró-inflamatórias TNF α , IL6 e IL1-beta estavam mais presentes na placenta obtida de mulheres obesas que de mulheres magras (CHARLIER *et al*, 2008). Além disso, outros estudos empregando este modelo também tem mostrado que a obesidade durante a gestação promove alteração nos mecanismos de controle da ingestão (KIRK *et al*, 2009) assim como danos hepáticos relacionados ao estresse oxidativo, elevada expressão de enzimas neoglicogênicas e deposição de gordura neste órgão (McCURDY *et al*, 2009).

Em nosso estudo a exposição pré natal à nutrição hiperlipídica promoveu efeitos deletérios importantes para metabolismo da prole HN com 12 semanas de vida. A prole de mães que fizeram uso da dieta rica em gordura durante a gestação apresentou maior ganho de peso e massa de tecido adiposo epididimal. Estes parâmetros foram acompanhados pelo aumento dos níveis de triglicérides no fígado tanto no adulto como na prole recém desmamada (d28).

O armazenamento de gorduras no fígado é uma manifestação importante da síndrome metabólica e resistência a insulina (MARCHESINI *et al*, 2003). Contudo, nosso modelo não apresentou intolerância a glicose ou aumento na glicemia basal na primeira fase experimental (12 semanas), embora peso corpóreo e massa de tecido adiposo tenham sido maiores no grupo HN.

Estes resultados podem ser reflexo de uma resposta adaptativa do animal ao ambiente pró-inflamatório ao que foi exposto desde a fase intrauterina. Neste sentido, nós avaliamos os níveis de insulina, leptina, IL1beta e TNFalfa no soro materno durante a gestação e lactação. Nosso dados mostram que o sangue materno apresenta níveis aumentados tanto dos hormônios como das citocinas pró-inflamatórias. Embora, neste estudo a análise de macrófagos ativos na placenta não tenha sido realizada é possível que a placenta das mães obesas apresente maior quantidade deste tipo celular. Em um estudo realizado por Charlier e colaboradores demonstraram o aumento deste tipo de célula na placenta de mulheres obesas (Chalier *et al*, 2008). Desta maneira, durante a gestação o feto experimenta condições que podem levar a um processo de adaptação fisiológica e distúrbios metabólicos na prole adulta. Neste sentido, vale ressaltar que a prole HN apresentou maiores níveis de TNFalfa, IL1beta, insulina e leptina no soro na fase adulta, o que embora não caracterize um resposta as condições experimentadas durante a fase intrauterina, pode refletir o ganho de peso decorrente de danos na sinalização hormonal. Alguns autores tem sugerido que a hiperinsulinemia e hiperleptnemia durante a gestação pode ser uma adaptação fisiológica (SEEBER; SMITH; WADDELL, 2002) ou resultado do desenvolvimento da resistência hormonal (HOWIE *et al*, 2009).

É conhecido que o quadro inflamatório subclínico é um grande promotor da resistência molecular a sinalização hormonal, principalmente da insulina e leptina (EVERARD *et al*, 2012; MOHAMMED *et al*, 2012). Em nosso modelo o grupo HN apresentou menor fosforilação hepática de proteínas da via de sinalização da insulina quando esta foi administrada por via intraperitoneal, indicando que o quadro de resistência a insulina estava instalado neste tecido. Além disso, as proteínas IKK e JNK encontravam-se mais fosforiladas na prole de mães obesas (HN). Este é um aspecto importante, desde que estas proteínas são responsáveis pela fosforilação da proteína

IRS-1 em serina, levando a danos nos sinais da insulina no tecido (HE *et al*, 2006; MACLAREN *et al*, 2008).

Do ponto de vista metabólico, o fígado da prole HN também apresentou características moleculares alteradas que podem estar relacionada a deposição de gordura no fígado. No fígado da prole HN tanto a síntese de glicose pela neoglicogênese, como a síntese de ácidos graxos parecem estar ativadas, visto que a expressão da PEPCK foi maior no grupo HN e a fosforilação da proteína ACC foi reduzida. A proteína ACC na forma desfosforilada permite sua participação na síntese de malonil-CoA, um importante precursor dos ácidos graxos e também um modulador negativo da sua oxidação na mitocôndria. Desta maneira, as condições metabólicas do fígado da prole HN favorecem o acúmulo de gordura neste tecido.

Um importante aspecto que deve ser discutido neste estudo é a contribuição da massa adiposa adquirida durante o desenvolvimento para o quadro apresentado na fase adulta. Na tentativa de compreender a contribuição do consumo materno de dieta rica em gordura para os danos na fase adulta, alguns estudos foram realizados com a prole logo após o desmame. Como, já citado anteriormente, os animais do grupo HN apresentaram maior peso ao nascer, maior percentual de massa adiposa nos dois períodos estudados e maior ganho de peso ao longo das 25 semanas observadas. Resultados semelhantes foram relatados por Carmody e colaboradores (2011) em um experimento que descreveu os efeitos do uso materno de dieta hiperlipídica associada ou não à resistência insulina materna na prole tratada com dieta padrão. De acordo, com Dunn e Bale (2011) estes efeitos podem ser perpetuados como demonstrado em fêmeas da terceira geração de mães tratadas com dieta hiperlipídica durante a gestação que apresentaram maior ganho de peso corpóreo e massa adiposa, sugerindo um efeito transgeracional para o modelo estudado.

A dieta materna oferecida às matrizes do grupo HN foi capaz de modular negativamente a homeostase glicêmica da prole de 4 semanas que apresentou menor tolerância à glicose, comparada à prole controle. Um

estudo realizado por Song e colegas (2012) os autores demonstraram a clara relação entre a dieta materna e a homeostase da glicose ao comparar proles de fêmeas tratadas com dieta hiperlipídica e padrão associada à hiperglicemia induzida por estreptozotocina. Tendo demonstrado que a nutrição pré-natal apresentou efeitos negativos mais pronunciados na tolerância à glicose e na deposição hepática de gordura que a hiperglicemia materna.

O tecido hipotalâmico é mais sensível a mudanças nos níveis de substratos energéticos e citocinas pró-inflamatórias, sendo comumente o primeiro tecido a apresentar resistência aos hormônios insulina e leptina, e dele partem importantes alterações observadas nos tecidos periféricos após o consumo excessivo de gorduras durante o desenvolvimento (BELGARDT, *et al*, 2010; PRADA *et al*, 2005; THALER; SCHWARTZ, 2010). Em nosso modelo a prole com 28 dias de vida apresentou redução importante na sensibilidade a insulina no hipotálamo, como pode ser observado pela menor fosforilação da AKT e menor inibição da AMPK neste tecido. Interessantemente, estes efeitos foram acompanhados pela maior fosforilação das proteínas serina quinases JNK e IKK, maior expressão de NFkB e maiores níveis séricos de TNF α (prole com 12 semanas). A atividade da quinase JNK promove o bloqueio do sinal intracelular da insulina, provocando danos nos efeitos anabólicos e anorexigênicos no hipotálamos (MASHARANI, *et al*, 2011; TANTI; JAGER, 2009).

O sinal hipotalâmico da insulina tem importante papel no controle da secreção da insulina pelas ilhotas e, portanto, este dano na sinalização hipotalâmica em um estágio inicial do desenvolvimento pode ter contribuído para o ganho de peso observado na prole HN e na deposição de gordura no fígado deste animais. A proteína NFkB é um fator de transcrição liberado pela fosforilação do I κ B por intermédio da serina quinase IKK. Translocando-se ao núcleo, o NFkB promove a produção de mais citocinas próinflamatórias, o que desencadeia em um efeito de “ciclo-vicioso” (CAPURSO; CAPURSO, 2012; DHINGRA, *et al*, 2009; KLEEMANN, *et al*,

2010; IHEKWABA, 2004; LIU, *et al*, 2012, MELO, *et al*, 2011). Estes resultados sugerem que a prole HN apresenta ativo, desde o desmame, os mecanismos moleculares que estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como pode ser observado pelo níveis de TNFalfa e IL1beta no soro. Sendo assim não podemos descartar que desde o desmame, a ativação das vias pró-inflamatórias por estas citocinas, seja responsável pela efeitos observados na prole adulta, tais como ganho de peso, maior insulinemia de jejum e resistência molecular a insulina no fígado e hipotálamo

Finalmente, um importante aspecto a ser ressaltado nos dados obtidos com a prole logo após o desmame é o fato da proteína ACC hipotalâmica ter sido modulada na prole HN. A maior fosforilação da ACC neste tecido favorece a maior ingestão de ração e menor gasto energético. De acordo com vários estudos utilizando diferentes ferramentas moleculares e farmacológicas, condições que levam a menor fosforilação da ACC (maior atividade enzimática) resultam em menor fome, assim como o aumento da fosforilação da ACC resulta em maior ingestão de ração (OLSON *et al*, 2010; STEVANOVIC *et al*, 2012). Fisiologicamente a ACC é fosforilada e inibida pela atividade quinase da AMPK, um conhecido sensor energético celular (SCHREURS; KUIPERS; VAN DER LEIJ, 2010). Em nosso estudo nenhuma alteração basal foi observada na prole HN que justificasse o aumento da fosforilação observado na ACC hipotalâmica. Contudo, a infusão intraperitoneal de insulina nos animais do grupo HN não resultou em menor fosforilação da AMPK, Diferentemente do ocorrido no grupo NN, que apresentou significativa redução da fosforilação da AMPK após desafio com a insulina. Tal efeito pode ser responsável pelo elevado ganho de peso observado nos animais HN.

Desta maneira, as alterações observadas na prole adulta parecem ter origem precoce, desde que várias alterações moleculares foram detectadas logo após o desmame e podem contribuir para mudanças comportamentais e hormonais que favorecem o ganho de peso, e resistência a insulina e a diabetes. Vale ressaltar que as características hormonais bem como o

conteúdo de nutrientes do ambiente intrauterino podem concorrer para que a prole mesmo antes do nascimento já apresente alterações em importantes vias metabólicas que concorrem para o estabelecimento do distúrbio metabólico.

CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados permitiram concluir que a exposição fetal a um ambiente desfavorável do ponto de vista nutricional e hormonal pode promover adaptações metabólicas logo após o desmame. Estas características metabólicas são detectadas na prole recém-desmamada através da ativação de proteínas pró-inflamatórias tanto no hipotálamo como no fígado e menor sensibilidade a insulina. Embora a relação causal não tenha sido investigada, as alterações moleculares na prole recém-desmamada podem estar na origem do ganho de peso, armazenamento de TG no fígado e resistência a insulina hepática na fase adulta. Assim, a exposição à nutrição pré-natal excessiva e desbalanceada mostrou-se precursora de alterações críticas ao metabolismo da progênie, consistentes com o quadro de síndrome metabólica. Desta forma, ressalta-se o risco do consumo restrito de gorduras saturadas, especialmente durante a gestação e lactação, considerando os riscos maternos e à prole que a alimentação inadequada oferece.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARDH, C.D.; AHRÉN, B. Switching from high fat to low fat diet normalizes glucose metabolism and improves glucose-stimulated insulin secretion and insulin sensitivity but not body weight in C57BL/6J mice. **Pancreas**, 2012; 41(2):253-7.

ANGULO, P. Nonalcoholic fatty liver disease. **Revista de Gastroenterología de México**, 2005; 3:52-6.

ARAÚJO, E.P.; De SOUZA, C.T.; UENO, M.; CINTRA, D.E.; BERTOLO, M.B.; CARVALHEIRA, J.B.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Infliximab restores glucose homeostasis in animal model of diet-induced obesity and diabetes. **Endocrinology**, 2007; 148(12):5991-7.

ATTIG, L.; GABORY, A.; JUNIEN, C. Early nutrition and epigenetic programming: Chasing shadows. **Current opinion in Clinical Nutrition & Metabolic care**, 2010; 13(3):294:93.

ATTIG, L.; GABORY, A.; JUNIEN, C. Nutritional developmental epigenomics: immediate and long-lasting effects. **The proceedings of the Nutrition Society**, 2010; 69(2):221-31.

BARBUIO, R.; MILANSKI, M.; BERTOLO, M.B.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Infliximab reverses steatosis and improves insulin signal transduction in liver of rats fed a high fat diet. **Journal of Endocrinology**, 2007; 194(3):539-50.

BARKER, D.J.; OSMOND, C.; LAW, C.M. The intrauterine and early post natal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **Journal of Epidemiology & Community health**, 1989; 43(3):237-240.

BELGARDT, B.F.; MAUER, J.; WUNDERLICH, F.T.; ERNST, M.B.; PAL, M.; SPOHN, G.; BRÖNNEKE, H.S.; BRODESSER, S.; HAMPEL, B.; SCHAUSS, A.C.; BRÜNING, J.C. Hypothalamic and pituitary c-Jun N-terminal kinase 1 signaling coordinately regulates glucose metabolism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010; (13):6028-33.

BRUCE, K.D.; CAGAMPANG, F.R.; ARGENTON, M.; ZHANG, J.; ETHIRAJAN, P.L. BURDGE, C.D.; BATEMAN, A.C.; CLOUGH, G.F.; POSTON, L.; HANSON, M.A.; McCONNELL, J.M.; BYRNE, C.D. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. **Hepatology**, 2009; 50(6):1796-808.

BURDGE, G.C.; LILLYCROP, K.A.; JACKSON, A.A. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? **The British Journal of Nutrition**, 2009; 101(5):619-30.

CALUWAERTS, S.; LAMBIN, S.; VAN BREE, R.; PEETERS, H.; VERGOTE, I.; VERHAEGHE, J. Diet-induced obesity in gravid rats engenders early hyperadiposity in the offspring. **Metabolism: Clinical and Experimental**, 2007; 56(10):1431-8.

CAMBONIE, G.; COMTE, B.; YZYDORCZYK, C.; NTIMBANE, T.; GERMAIN, N.; LÊ, N.L.; PLADYS, P.; GAUTHIER, C.; LAHAIE, I.; ABRAN, D.; LAVOIE, J.C.; NUYT, A.M. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction, and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low-protein diet. **American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2007; 292(3):R1236-45.

CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascular Pharmacology**, 2012.

CARDOSO, A.R.; QUELICONI, B.B.; KOWALTOWSKI, A.J. Mitochondrial ion transport pathways: role in metabolic diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2010; 1797(6-7):832-8.

CARMODY, J.S.; WAN, P.; ACCILI, D.; ZELTSER, L.M.; LEIBEL, R.L. Respective contributions of maternal insulin resistance and diet to metabolic and hypothalamic phenotypes of progeny. **Obesity (Silver Spring)**, 2011; 19(3): 492–499.

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabologia**, 2002; 46(4): 419-25.

CASTRO, L.C.; ALVINA, R.L. Maternal obesity and pregnancy outcomes. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, 2002; 14(6):601-6.

CHARLIER, J.C.; BASU, S.; BINTEIN, T.; MINIUM, J.; HOTMIRE, K.; CATALANO, P.M.; HAUGUEL-DE-MOUZON, S. Obesity in pregnancy stimulates macrophage accumulation and inflammation in the placenta. **Placenta**, 2008; 29:274-281.

CHAUDHARY, N.; NAKKA, K.K.; MAULIK, N.; CHATTOPADHYAY, S. Epigenetic manifestation of **metabolic** syndrome and dietary management. **Antioxidants and Redox Signal**, 2012; 17(2):254-81.

CHEN, H.; SIMAR, D.; MORRIS, M.J. Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: interaction with postnatal nutritional environment. **PLoS One**, 2009; 16;4(7):e6259.

CINTRA, D.E.; PAULI, J.R.; ARAÚJO, E.P.; MORAES, J.C.; DE SOUZA, C.T.; MILANSKI, M.; MORARI, J.; GAMBERO, A.; SAAD, M.J.; VELLOSO, L.A. Interleukin-10 is a protective factor against diet-induced insulin resistance in liver. **Journal of Hepatology**, 2008; 48(4):628-37.

CNATTINGIUS, S.; BERGSTRÖM, R.; LIPWORTH, L.; KRAMER, M.S. Prepregnancy weight and the risk of adverse pregnancy outcomes. **The New England Journal of Medicine**, 1998; 15;338(3):147-52.

COLLINS, T.; COTRAN, R.S.; KUMAR, V. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 406-9.

DAHLGREN, J. NILSSON, C.; JENNISCHE, E.; HO, H.P.; ERIKSSON, E.; NIKLASSON, A.; BJÖRNTORP, P.; ALBERTSSON-WINKLAND, K.; HOLMÄNG, A. Prenatal cytokine exposure results in obesity and gender-specific programming. **American Journal of Physiology- Endocrinology and Metabolism**, 2001; 281(2):E326-34.

DAS, S.K.; BALAKRISHNAN, V. Role of cytokines in the pathogenesis of non-alcoholic Fatty liver disease. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, 2011; 26(2):202-9.

DELAGE, B.; DASHWOOD, R.H. Dietary manipulation of histone structure and function. **Annual Review of Nutrition**, 2008; 28:347-66.

DENTIN, R. BENHAMED, F.; PÉGORIER, J.P.; FOUFELLE, F.; VIOLLET, B.; VAULONT, S.; GIRARD, J.; POSTIC, C. Polyunsaturated fatty acids suppress

glycolytic and lipogenic genes through the inhibition of ChREBP nuclear protein translocation. **The Journal of Clinical Investigation**, 2005; 115(10):2843-54.

DESAI, M.; BABU, J. ROSS, M.G. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2007; 293(6):R2306-14.

DESAI, M.; GAYLE, D.; BABU, J. ROSS, M.G. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2005; 288(1):R91-6.

DHINGRA, S.; SHARMA, A.K.; ARORA, R.C.; SLEZAK, J.; SINGAL, P.K. IL-10 attenuates TNF- α -induced NF κ B pathway activation and cardiomyocyte apoptosis. **Cardiovascular Research**, 2009; 82: 59–66.

DRAKE, A.J.; MCPHERSON, R.C.; GODFREY, K.M.; COOPER, C.; LILLYCROP, K.A.; HANSON, M.A.; MEEHAN, R.R.; SECKL, J.R.; REYNOLDS, R.M. An unbalanced maternal diet in pregnancy associates with offspring epigenetic changes in genes controlling glucocorticoid action and fetal growth. **Clinical Endocrinology**, 2012.

DUARTE, A.C.G.O; FONSECA, D.F.; MANZONI, M.S.J.; SOAVE, C.F.; SENEFIGIORESE, M.; DÂMASO, A.R.; CHEIK, N.C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, 2006; 8: 340-1.

DUNN, G.A.; BALE, T.L. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. **Endocrinology**, 2011; 152(6):2228–2236.

EVERARD, A.; LAZAREVIC, V.; DERRIEN, M.; GIRARD, M.; MUCCIOLI, G.G.; NEVRINCK, A.M.; POSSEMIERS, S.; VAN HOLLE, A.; DE VOS, W.M.; DELZENNE, N.M.; SCHRENZEL, J.; CANI, P.D. Responses of gut microbiota and glucose and lipid metabolism to prebiotics in genetic obese and diet induced leptin-resistant mice. **Diabetes**, 2011; 60(11): 2775-86.

FAHRENKROG, S. HARDER, T.; STOLACZYK, E.; MELCHIOR, K.; FRANKE, K.; DUDENHAUSEN, J.W.; PLAGEMANN, A. Cross-fostering to diabetic rat dams affects early development of mediobasal hypothalamic nuclei regulating food intake, body weight, and metabolism. **Journal of Nutrition**, 2004; 134(3):648-54.

FAN, J.G.; ZHONG, L.; TIA, L.Y.; XU, Z.J.; LI, M.S.; WANG, G.L. Effects of ursodeoxycholic acid and/or low-calorie diet on steatohepatitis in rats with obesity and hyperlipidemia. **World Journal of Gastroenterology**, 2005; 21;11(15):2346-50.

FÉRÉZOU-VIALA, J.; ROY, A.F.; SÉROUGNE, C.; GRIPOIS, D.; PARQUET, M.; BAILLEUX, V.; GERTLER, A.; DELPLANQUE, B.; DJIANE, J.; RIOTTOT, M.; TAOUIS, M. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. **American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2007; 293(3):R1056-62.

FLEGAL, K.M.; CARROLL, M.D.; KUCZMARSKI R.J.; JOHNSON, C.L. Overweight and obesity in the United States: prevalence and trends, 1960-1994. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, 1998; 22(1):39-47.

FRANKS PW, LING C. Epigenetics and obesity: the devil is in the details. **BMC Medicine**, 2010; 21(8):88.

GALLOU-KABANI, C. VIGÉ, A.; GROSS, M.S.; RABÈS, J.P.; BOILEAU, C.; LARUE-ACHAGIOTIS, C.; TOMÉ, D.; JAIS, J.P.; JUNIEN, C. C57BL/6J and A/J mice fed a high-fat diet delineate components of metabolic syndrome. **Obesity (Silver Spring)**, 2007; 15(8):1996-2005.

GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; JUNIEN, C. Lifelong circadian and epigenetic drifts in metabolic syndrome. **Epigenetics**, 2007; 2(3):137-46.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; BEEDLE, A.S. Early life events and their consequences for later disease: a life history and evolutionary perspective. **American Journal of Human Biology**, 2007; 19(1):1-19.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. **Science**, 2004; 17;305(5691):1733-6.

GREGÓRIO, B.M.; SOUZA-MELLO, V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; AQUILA, M.B. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. **European Journal of Nutrition**, 2012; 200(3):293-300.

GUPTA, A.; SRINIVASAN, M.; THAMADILOK, S.; PATEL, M.S. Hypothalamic alterations in fetuses of high fat diet-fed obese female rats. **Journal of Endocrinology**, 2009; 200(3):293-300.

HE, J.; USUI, I.; ISHIZUKA, K.; KANATANI, Y.; HIRATANI, K.; IWATA, M.; BUKHARI, A.; HARUTA, T.; SASAOKA, T.; KOBAYASHI, M. Interleukin-1 alpha inhibits insulin signaling with phosphorylating insulin receptor substrate-1 on serine residues in 3T3-L1 adipocytes. **Molecular Endocrinology**, 2006(1):114-24.

HOWIE, G.J.; SLOBODA, D.M.; KAMAL, T.; VICKERS, M.H. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **The Journal of Physiology**, 2009; 15;587(Pt 4):905-15.

ICHIMURA, A.; HIRASAWA, A.; POULAIN-GODEFROY, O.; BONNEFOND, A.; HARA, T.; YENGO, L.; KIMURA, I.; LELOIRE, A.; LIU, N.; IIDA, K.; CHOQUET, H.; BESNARD, P.; LECOEUR, C.; VIVEQUIN, S.; AYUKAWA, K.; TAKEUCHI, M.; OZAWA, K.; TAUBER, M.; MAFFEIS, C.; MORANDI, A.; BUZZETTI, R.; ELLIOTT, P.; POUTA, A.; JARVELIN, M.R.; KÖRNER, A.; KIESS, W.; PIGEYRE, M.; CAIAZZO, R.; VAN HUL, W.; VAN GAAL, L.; HORBER, F.; BALKAU, B.; LÉVY-MARCHAL, C.; ROUSKAS, K.; KOUVATSI, A.; HEBEBRAND, J.; HINNEY, A.; SCHERAG, A.; PATTOU, F.; MEYRE, D.; KOSHIMIZU, T.A.; WOLOWCZUK, I.; TSUJIMOTO, G.; FROGUEL, P. Dysfunction of lipid sensor GPR120 leads to obesity in both mouse and human. **Nature**, 2012; 19;483(7389):350-4.

IHEKWABA, A.E.C; BROOMHEAD, D.S.; GRIMLEY, R.L.; BENSON, N.; KELL, D.B. Sensitivity analysis of parameters controlling oscillatory signalling in the NF-kB pathway: the roles of IKK and Ikb α . **Systems biology**, 2004; 1:1.

JUMP, D.B. BOTOLIN, D.; WANG, Y.; XU, J.; CHRISTIAN, B.; DEMEURE, O. Fatty acid regulation of hepatic gene transcription. **Journal of Nutrition**, 2005; 135(11):2503-6.

JUNIEN, C.; GALLOU-KABANI, C.; VIGÉ, A.; GROSS, M.S. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome. **Médecine Science**, 2005; 21(4):396-404.

KAPPEN, C.; KRUGER, C.; MACGOWAN, J.; SALBAUM, J.M.; Maternal diet modulates placenta growth and gene expression in a mouse model of diabetic pregnancy. **PLoS One**, 2012; 7(6):e38445.

KHAN, I.Y.; DEKOU, V.; HANSON, M.A.; POSTON. TAYLOR, P.D. Predictive adaptive responses to maternal high fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. **Circulation**, 2004; 110(9):1097-102

KHAN, I.Y.; TAYLOR, P.D.; DEKOU, V.; SEED, P.T.; LAKASING, L.; GRAHAM, D.; DOMINICZAK, A.F.; HANSON, M.A.; POSTON, L. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. **Hypertension**, 2003; 41(1):168-75.

KING, J.C. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. **Annual Review of Nutrition**, 2006; 26:271-91.

KIRK, S.L.; SAMUELSSON, A.M.; ARGENTON, M.; DHONYE, H.; KALAMATIANOS, T.; POSTON, L.; TAYLOR, P.D.; COEN, C.W. Maternal obesity induced by diet in rats

permanently influences central processes regulating food intake in offspring. **PLoS One**, 2009; 11;4(6):e5870.

KLEEMANN, R.; VAN ERK, M.; VERSCHUREN, L.; VAN DEN HOEK, A.M.; KOEK, M.; WIELINGA, P.Y.; JIE, A.; PELLIS,L.; BOBELDIJK-PASTOROVA, I.; KELDER, T.; TOET, K.; WOPEREIS, K.; CNUBBEN, N.; EVELO, C.; VAN OMMEN, B.; KOOISTRA, T. Time-resolved and tissue-specific systems analysis of the pathogenesis of insulin resistance. **PLoS One**, 2010; 5(1): e8817.

LEVIN, B.E. Metabolic imprinting: critical impact of the prenatal environment on the regulation of energy homeostasis. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, 2006; 361:1107–21.

LEVIN, B.E. The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. **Obesity Research**, 2000; 8: 342-7.

LI, M.; SLOBODA, D.M.; VICKERS, M.H. Maternal obesity and developmental programming of metabolic disorders in offspring: Evidence from animal models. **Experimental Diabetes Research**, 2011.

LILLYCROP, K.A. Effect of maternal diet on the epigenome: implications for human metabolic disease. **The Proceedings of the Nutrition Society**, 2011; 70(1):64-72.

LILLYCROP, K.A.; BURDGE, G.C. The effect of nutrition during early life on the epigenetic regulation of transcription and implications for human diseases. **Journal of Nutrigenetics and Nutrigenomics**, 2011; 4(5):248-60.

LIU, F.; XIA, Y.; PARKER, A.S.; VERMA, I.M. IKK BIOLOGY. Immunological **Reviews Special Issue: NF-Kb**, 2012; 246(1): 239-253.

LOPEZ-MIRANDA, J.; PÉREZ-MARTINEZ, P.; MARIN, C.; FUENTES, F.; DELGADO, J.; PÉREZ-JIMENES, F. Dietary fat, genes and insulin sensitivity. **Journal of Molecular Medicine**, 2007; 85(3):213-26.

MARCHESINI, G.; BUGIANESI, E.; FORLANI, CERRELLI, F.; LENZI, M.; MANINI, R. Nonalcoholic fatty liver steatohepatitis and the metabolic syndrome. **Hepatology**, 2003; 37:917-23.

MACLAREN, R.; CUI, W.; SIMARD, S.; CIANFLONE, K. Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. **Journal of Lipid Research**, 2008; 49(2):308-23.

MASHARANI, U.B.; MADDUX, B.A.; LI, X.; SAKKAS, G.K.; MULLIGAN, K.; SCHAMBELAN, M.; GOLDFINE, I.D.; YOUNGREN, J.F. Insulin resistance in non-obese subjects is associated with activation of the JNK pathway and impaired insulin signaling in skeletal muscle. **PLoS One**, 2011; 6(5): e19878.

MCCURDY, C.R.; BISHOP, J.M.; WILLIAMS, S.M.; GRAYSON, B.E.; SMITH, B.E.; FRIEDMAN, J.E.; GROVE, K.L. Maternal high-fat diet triggers lipotoxicity in the fetal livers of nonhuman primates. **The Journal of Clinical Investigation**, 2009; 119(2):323-35.

MEI, Z.; GRUMMER-STRAWN, L.M.;SCANLON, K.S. Does overweight in infancy persist through the preschool years? An analysis of CDC Pediatric Nutrition Surveillance System data. **Sozial- und Praventivmedizin**, 2003; 48(3):161-7.

MEI, Z.; SCANLON, K.S.; GRUMMER-STRAWN, L.M.; FREEDMAN, D.S.; YIP, R.; TROWBRIDGE, F.L. Increasing prevalence of overweight among US low-income preschool children: the Centers for Disease Control and Prevention pediatric nutrition surveillance, 1983 to 1995. **Pediatrics**, 1998; 101(1):E12.

MELO, A.M.; BITTENCOURT, P.; NAKUTIS, F.S.; SILVA, A.P.; CURSINO, J.; SANTOS, G.A.; ASHINO, N.G.; VELLOSO, L.A.; TORSONI, A.S.; TORSONI, M.A. Solidago chilensis Meyen hydroalcoholic extract reduces **JNK/I κ B** pathway activation and ameliorates insulin resistance in diet-induced obesity mice. **Experimental Biology and Medicine**, 2011; 236(10): 1147-55.

MOHAMMED, N.; TANG, L.; JAHANGIRI, A.; DE VILLIERS, W.; ECKHARDT, E. Elevated IgG levels against specific bacterial antigens in obese patients with diabetes and in mice with diet-induced obesity and glucose intolerance. **Metabolism**, 2012.

MOLLER, D.E.; KAUFMAN, K.D. Metabolic syndrome: a clinical and molecular perspective. **Annual Review of Medicine**, 2005; 56:45-62.

MOORE, T., HAIG, D. Genomic imprinting in mammalian development: a parental tug-of-war. **Trends in Genetics**, 1991; 7(2):45-9.

MOUZAKI, M.; ALLARD J.P. The Role of Nutrients in the Development, Progression, and Treatment of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. **Journal of Clinical Gastroenterology**, 2012; 29.

MUST, A.; STRAWSS, R.S. Risks and consequences of childhood and adolescent obesity. . **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders**, 1999; 2:S2-11.

NAEYE, R.L. Maternal body weight and pregnancy outcome. **American Journal of Clinical Nutrition**, 1990; 52:273-279.

OLSON, D.P.; PULINILKUNNIL, T.; CLINE, G.W.; SHULMAN, G.I.; LOWELL, B.B. GENE KNOCKOUT OF ACC2 HAS LITTLE EFFECT ON BODY WEIGHT, FAT MASS, OR FOOD INTAKE. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 2010; 107(16):7598-603.

PARENTE, L.B.; AGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. **Clinical Nutrition**, 2008; 27(4):623-34.

PETERSEN, K.F. DUFOUR, S.; SAVAGE, D.B.; BILZ, S.; SOLOMON, G.; YONEMITSU, S.; CLINE, G.W.; BEFROY, D.; ZEMANY, L.; KAHN, B.B.; PAPADEMETRIS, X.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I. The role of skeletal muscle insulin resistance in the pathogenesis of the metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 2007; 104(31):12587-94.

PLAGEMANN, A. HARDER, T.; KOHLHOFF, R.; ROHDE, W.; DÖRNER, G. Overweight and obesity in infants of mothers with long-term insulin-dependent diabetes or gestational diabetes. **International journal of obesity and related metabolic disorders**, 1997; 21(6):451-6.

PRADA, P.O. ZECCHIN, H.G.; GASPARETTI, A.L.; TORSONI, M.A.; UENO, M.; HIRATA, A.E.; COREZOLA DO AMARAL, M.E.; HÖER, N.F.; BOSCHERO, A.C.; SAAD, M.J. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1ser307 phosphorylation in a tissue-specific fashion. **Endocrinology**, 2005; 146(3):1576-87.

RITCHIE, L.D.; IVEY, S.L.; WOODWARD-LOPEZ, G.; CRAWFORD, P.B. Alarming trends in pediatric overweight in the United States. **Sozial- und Präventivmedizin**, 2003; 48(3):168-77.

SCHREURS, M.; KUIPERS, F.; VAN DER LEIJ, F.R. Regulatory enzymes of mitochondrial beta-oxidation as targets for treatment of the metabolic syndrome. **Obesity Reviews**, 2011; 11(5):380-8.

SCHULZ, L.O.; BENNETT, P.H.; RAVUSSIN, E.; KIDD, J.R.; KIDD, K.K.; ESPARZA, J.; VALENCIA, M.E. Effects of traditional and western environments on prevalence of type 2 diabetes in Pima Indians in Mexico and the U.S. **Diabetes Care**, 2006; 29(8):1866-71.

SEEBER, R.M.; SMITH, J.T.; WADDELL, B.J. Plasma leptin-binding activity and hypothalamic leptin receptor expression during pregnancy and lactation in the rat. **Biology of Reproduction**, 2002; 66(6):1762-7.

SHANKAR, K.; HARRELL, A.; LIU, X.; GILCHRIST, J.M.; RONIS, M.J.; BADGER, T.M. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2008; 294(2):R528-38.

SILVERMAN, B.L.; RIZZO, T.; GREEN, O.C.; CHO, N.H.; WINTER, R.J.; OGATA, E.S.; RICHARDS, G.E.; METZGER, B.E. Long-term prospective evaluation of offspring of diabetic mothers. **Diabetes**, 1991; 40 Suppl 2:121-5.

SILVERMAN, B.L.; RIZZO, T.A.; CHO, N.H.; METZGER, B.E. Long-term effects of the intrauterine environment. **Diabetes Care**, 1998; 21:B142-9.

SONG, Y.; LI, J.; ZHAO, Y.; ZHANG, Q.; LIU, Z.; LI, J.; CHEN, X.; YANG, Z.; YU, C.; XIAO, X. Severe maternal hyperglycemia exacerbates the development of insulin resistance and fatty liver in the offspring on high fat diet. **Experimental Diabetes Research**, 2012.

SOUZA, M.R.; DINIZ, M.D.E.F.; MEDEIROS-FILHO, J.E.; ARAÚJO, M.S. Metabolic syndrome and risk factors for non-alcoholic fatty liver disease. **Arquivos de Gastroenterologia**, 2012; 49(1):89-96.

STEVANOVIC, D.; JANJETOVIC, K.; MISIRKIC, M.; VUCICEVIC, L.; SUMARAC-DUMANOVIC, M.; MICIC, D.; STARCEVIC, V.; TRAJKOVIC, V. Intracerebroventricular administration of metformin inhibits ghrelin-induced hypothalamic AMP-Kinase signaling and food intake. **Neuroendocrinology**, 2012.

TANTI, J.F.; JAGER, J. Cellular mechanisms of insulin resistance: role of stress-regulated serine kinases and insulin receptor substrates (IRS) serine phosphorylation. **Current Opinion in Pharmacology**, 2009; 9(6):753-62.

TAYLOR, P.D. KHAN, I.Y.; LAKASING, L.; DEKOU, V.; O'BRIEN-COKER, I.; MALLET, A.I.; HANSON, M.A.; POSTON, L. Uterine artery function in pregnant rats fed a diet supplemented with animal lard. **Experimental Physiology**, 2003; 88(3):389-98.

THALER, J.O.; SCHWARTZ, M.W. Minireview: Inflammation and **obesity** pathogenesis: the hypothalamus heats up. **Endocrinology**, 2010; 151(9):4109-15.

THOMPSON, J.A.; REGNAULT, T.R. In utero origins of adult insulin resistance and vascular dysfunction. **Seminars in Reproductive Medicine**, 2011; 29(3):211-24.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Inflammatory mechanisms in the regulation of insulin resistance. **Molecular Medicine**, 2008; 14(3-4):222-31.

VELLOSO, L.A.; ARAÚJO, E.P.; DE SOUZA, C.T. Diet-Induced Inflammation of the Hypothalamus in Obesity. **Neuroimmunomodulation**, 2008; 15(3):189-93.

VICKERS, M.H.; BREIER, B.H.; CUTFIELD, W.S.; HOFMAN, P.L.; GLUCKMAN, P.D. Fetal origins of hyperphagia, obesity and hypertension and its postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American Journal of Physiology**, 2000; 279(1):E83-7.

WATERLAND, R.A. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. **The Journal of Pediatrics**, 2006; 149(5):S137-42.

WILD, S.; ROGLIC, G.; GREEN, A.; SICREE, R.; KING, H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 200 and projections for 2030. **Diabetes Care**, 2004; 27(5):1047-53.

World Health Organization. **2010 World Health Report**.

World Health Organization. **2011 World Health Report**.

WULLAERT, A.; VAN LOO, G.; HEYNINCK, K.; BEYAERT, R. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor-kappaB: effects on liver homeostasis and beyond. **Endocrine Reviews**, 2007; 28(4):365-86.

ZHANG, J. WANG, C.; TERRONI, P.L.; CAGAMPANG, F.R.; HANSON M.; BYRNE, C.D. High-unsaturated-fat, high-protein, and low-carbohydrate diet during

pregnancy and lactation modulates hepatic lipid metabolism in female offspring. **American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 2005; 288(1):R112-8.

ANEXO: CERTIFICADO CEUA

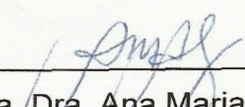
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

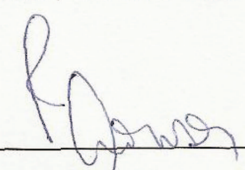
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Sinalização da insulina e homeostase da glicose na prole de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica" (protocolo nº 2577-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Marcio Alberto Torsoni / Nicole Guimarães Ashino, 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 12 de dezembro de 2011.

Campinas, 12 de dezembro de 2011.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva