



Laís Angélica de Paula Simino

**OBESIDADE MATERNA NA GESTAÇÃO E/OU LACTAÇÃO: IMPACTO  
SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO E SENSIBILIDADE À DIETA  
HIPERLIPÍDICA NA PROLE**

Limeira

2015





Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Ciências Aplicadas

Laís Angélica de Paula Simino

**OBESIDADE MATERNA NA GESTAÇÃO E/OU LACTAÇÃO: IMPACTO  
SOBRE O METABOLISMO LIPÍDICO E SENSIBILIDADE À DIETA  
HIPERLIPÍDICA NA PROLE**

Dissertação de Mestrado apresentada à  
Faculdade de Ciências Aplicadas da  
Universidade Estadual de Campinas -  
UNICAMP, para obtenção do título de  
Mestra em Ciências da Nutrição e do  
Esporte e Metabolismo.  
Área de concentração: Metabolismo e  
Biologia Molecular

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Souza Torsoni

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marciane Milanski

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA PELA ALUNA LAÍS ANGÉLICA DE PAULA  
SIMINO E ORIENTADA PELA PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> ADRIANA SOUZA  
TORSONI.

**LIMEIRA,**

**2015**

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

Si45o Simino, Laís Angélica de Paula, 1989-  
Obesidade materna na gestação e/ou lactação : impacto sobre o metabolismo lipídico e sensibilidade à dieta hiperlipídica na prole / Laís Angélica de Paula Simino. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Adriana Souza Torsoni.

Coorientador: Marciane Milanski.

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

1. Obesidade. 2. Dieta hiperlipídica. 3. Metabolismo. I. Torsoni, Adriana Souza. II. Milanski, Marciane. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Aplicadas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Maternal obesity during gestation and/or lactation : impact on lipid metabolism and HFD sensibility in offspring

**Palavras-chave em inglês:**

Obesity

High fat diet

lipid metabolism

**Área de concentração:** Metabolismo e Biologia Molecular

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

**Banca examinadora:**

Adriana Souza Torsoni [Orientador]

Letícia Martins Ignácio de Souza

Andressa Coope dos Santos

**Data de defesa:** 26-01-2015

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

**Autor:** Laís Angélica de Paula Simino

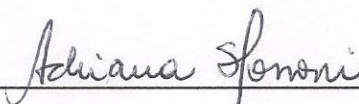
**Título:** Obesidade materna na gestação e/ou lactação: impacto sobre o metabolismo lipídico e sensibilidade à dieta hiperlipídica na prole.

**Natureza:** Dissertação de Mestrado

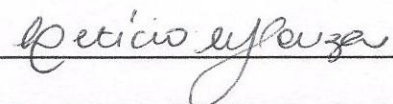
**Instituição:** Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas

**Data da Defesa:** Limeira, 26 de Janeiro de 2015

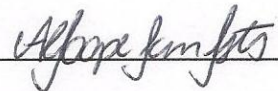
**BANCA EXAMINADORA**



Profª Drª Adriana Souza Torsoni (Orientadora)



Profª Drª Letícia Martins Ignácio de Souza



Profª Drª Andressa Coope dos Santos



## **RESUMO**

O estado nutricional no início da vida está criticamente envolvido no fenótipo metabólico da prole na idade adulta. No entanto, as mudanças provocadas pelo consumo materno de dieta rica em gordura (DH) no período pré ou pós-natal deve ser melhor exploradas. No presente trabalho, avaliamos a contribuição do consumo de DH materna durante a gestação e lactação sobre os danos no metabolismo lipídico hepático da prole. Além disso, investigamos se exposição precoce a uma supernutrição é capaz de programar a prole para responder de forma mais prejudicial para ao insulto da DH na vida adulta. No dia do nascimento (d0), a prole de mães obesas apresentou uma diminuição na expressão de *Cpt1a* e *Acadvl*, aumento na expressão de *Agpat* e *Gpam*, e menor teor de *miR-122* no fígado. Para confirmar a hipótese de que o período de gestação, por si só, poderia alterar o metabolismo lipídico da prole, foi utilizado modelo de *crossfostering*. A prole gerada por mãe obesa que foi amamentada por mãe controle apresentou aumento no peso corporal e aumento da expressão de *Agpat* e *Gpam* no d28 em comparação com a prole de mãe controle que foi amamentada por mãe obesa. Na vida adulta (d82), a reintrodução a DH resultou em maior ganho de peso e maior teor de lipídio hepático na prole de mães obesas. Estes efeitos foram acompanhados por um desbalanço no metabolismo lipídico, demonstrado pela redução da expressão de *Cpt1a* e *Acadvl* e aumento na expressão de *Agpat* e *Gpam*, associados a menor expressão de *miR-122* no fígado e menor conteúdo de p-HSL no tecido adiposo. Nossos dados sugerem que o consumo materno de DH durante a gestação leva à diminuição da expressão de *miR-122* na prole, resultando em alterações metabólicas no início da vida que podem alterar permanentemente a homeostase lipídica e aumentar significativamente a susceptibilidade à obesidade e acúmulo de lipídios ectópica na vida adulta.

Palavras-chave: obesidade, dieta hiperlipídica, metabolismo





## **ABSTRACT**

*Nutritional status in early life is critically involved in the metabolic phenotype of offspring in adulthood. However the changes triggered by maternal consumption of high-fat diet (HFD) in pre- or postnatal period should be better set out. Here we evaluated the contribution of maternal HFD consumption during gestation and lactation on hepatic lipid metabolism damages observed in the offspring. Moreover we investigate whether early overnutrition program offspring to more harmful response to HFD. In the delivery day (d0) pups from obese dams showed a decrease in Cpt1a and ACADVL expression, increase in Agpat and Gpat expression, and lower miR-122 content in liver. To confirm the hypothesis that the gestational period, by itself, could alter lipid metabolism, we used cross-fostered model. Pups fostered to chow dams presented an increase in body weight and higher Agpat and Gpat expression on d28 compared to pups fostered to HFD dams. In adult life (d82), the reintroduction of HFD resulted higher body weight gain and hepatic lipid content in offspring from obese dams. These effects were accompanied by impaired in lipid metabolism, demonstrated by reduced Cpt1a and Acadvl and increased Agpat and Gpat expression associated with lower expression of liver miR-122 and lower p-HSL in WAT. Our data suggests that maternal HFD consumption during gestational period leads to decreased expression of miR-122 in the offspring resulting in metabolic changes in early life that can permanently alter lipid homeostasis and significantly increase susceptibility to obesity and ectopic lipid accumulation.*

*Keywords: obesity, high fat diet, metabolism*



## ***SUMÁRIO***

|                                                                                                                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>INTRODUÇÃO.....</b>                                                                                                                                              | <b>01</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                               | <b>12</b> |
| Objetivo Geral.....                                                                                                                                                 | 12        |
| Objetivos Específicos.....                                                                                                                                          | 12        |
| <b>ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>                                                                                                                                       | <b>13</b> |
| Nutrition overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote deleterious response to HFD in later life..... | 13        |
| <b>DISCUSSÃO E CONCLUSÃO .....</b>                                                                                                                                  | <b>33</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                             | <b>39</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                                                                                  | <b>45</b> |
| Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal.....                                                                                                        | 45        |



*Aos meus pais, Geraldo e Maria Angélica,  
que escreveram comigo cada página da  
minha vida.*



## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço, primeira e imensamente, aos meus pais, Geraldo e Maria Angélica Simino, por serem os melhores exemplos que um filho poderia ter e por sempre me proporcionarem tudo o que estava ao alcance, sem medir esforços, para que eu tivesse todo o apoio e estrutura para buscar meu caminho e ao meu irmão, Douglas Simino, que me mostra diariamente o quão difícil é conviver com alguém com qualidades e defeitos iguais aos nossos, mas que isso também é um grande aprendizado.*

*Ao meu noivo, Thiago Rabelo, por todo o amor, apoio, compreensão e paciência sem limites.... Obrigada por sempre acreditar em mim, por aguentar meus longos períodos de estresse e por me fazer ser uma pessoa melhor. Sem você, nada disso teria sido possível!*

*À minha pequena, meu anjinho de quatro patas, Belzinha, que faz com que seja impossível acordar de mau humor e que parece adivinhar quando preciso de um "chamego".*

*À minha orientadora, mãe científica, Adriana Torsoni. Obrigada por me acolher e por ter me ensinado tudo que sei hoje. Minha admiração por você vem desde muito antes de eu pensar em entrar no mundo da pesquisa e só cresce a cada dia. Espero que a hipótese do "imprinting" seja verdadeira comigo e que, um dia, eu possa chegar perto de ser uma pessoa, professora e pesquisadora tão boa quanto você!*

*Aos meus co-orientadores, professores e pesquisadores que admiro muito, Márcio Torsoni e Marciane Milanski, obrigada pelo acolhimento, por todo o conhecimento compartilhado e todo o apoio.*

*Às queridas e competentes Andressa Coope e Letícia Ignácio de Souza, agradeço por fazerem parte da minha banca avaliadora, por contribuírem com tanta boa vontade para o desenvolvimento desse trabalho. Saibam que me espelho muito em*

*vocês e que vocês são grandes exemplos de como trilhar esse caminho difícil porém gratificante que escolhemos.*

*À todos os colegas do LabDiMe, agradeço pela convivência diária e todas as experiências divididas. Em especial, agradeço à Thaís de Fante, Andressa Reginato, Simone Lemes e Tanyara Baliani, pelo compartilhamento de informações e por toda a ajuda;*

*Às amigas que esse período do Mestrado me proporcionou: Arine Melo, Caroline Okino, Fernanda Borges, Mariana Portovedo e Marina Fontana, obrigada por sempre estarem dispostas a ajudar, por compartilharem os bons e os maus momentos e por fazerem com que o trabalho seja sempre mais leve e divertido!*

*Aos animais experimentais, que involuntariamente doam suas vidas em prol da pesquisa.*

*E à todos que, de alguma forma, contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho:*

*Muito obrigada!*



*“Aprendi que vai demorar muito para me transformar na pessoa que quero ser e devo ter paciência. Mas aprendi, também, que posso ir além dos limites que eu próprio coloquei.”*

*Charles Chaplin*



## ***LISTA DE ABREVIATURAS***

|        |                                                 |
|--------|-------------------------------------------------|
| ACADVL | Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa    |
| ACAT   | Acil-CoA acetiltransferase / Tiolase            |
| ACC    | Acetil-CoA carboxilase                          |
| AG     | Ácido graxo                                     |
| AGPAT  | Acilglicerolfosfato Aciltransferase             |
| AMPK   | Proteína quinase ativada por AMP                |
| CHOL   | Colesterol                                      |
| CPT1A  | Carnitina palmitoil transferase 1               |
| DCNT   | Doença crônica não transmissível                |
| DCV    | Doenças cardiovasculares                        |
| DGAT   | Diglicerídeo aciltransferase                    |
| DH     | Dieta hiperlipídica                             |
| DHGNA  | Doença hepática gordurosa não alcoólica         |
| DM2    | Diabetes mellitus tipo 2                        |
| ECH    | Enoil-CoA hidratase                             |
| FAS    | Ácido graxo sintase                             |
| GPAM   | Glicerol-3-fosfato aciltransferase mitocondrial |
| GPAT   | Glicerol-3-fosfato aciltransferase              |
| GTTip  | Teste de tolerância a glicose intraperitoneal   |
| HAD    | $\beta$ -hidroxiacil-CoA desidrogenase          |

|               |                                                        |
|---------------|--------------------------------------------------------|
| HEPG2         | Linhagem celular de hepatoma humano                    |
| HNF4 $\alpha$ | Fator nuclear hepático 4 $\alpha$                      |
| I $\kappa$ K  | Inibidor de quinase kappa B                            |
| IL1 $\beta$   | Interleucina 1beta                                     |
| IMC           | Índice de massa corporal                               |
| ITTip         | Teste de tolerância a insulina intraperitoneal         |
| JNK           | Quinase c-Jun N-Terminal                               |
| miR/MiRna     | microRNA                                               |
| miR-122       | microRNA 122                                           |
| miR-370       | microRNA 370                                           |
| MOGAT         | Monoglicerídeo Aciltransferase                         |
| NF $\kappa$ B | Fator nuclear kappa B                                  |
| PAP           | Fosfatidato fosfatase                                  |
| RISC          | Complexo silenciador induzido por RNA                  |
| SCD1          | Sterol-CoA dessaturase 1                               |
| SREBP1c       | Proteína de ligação a elemento regulador de esterol 1c |
| sRNA          | Pequeno RNA                                            |
| TAG           | Triacilglicerol                                        |
| TNF $\alpha$  | Fator de necrose tumoral alfa                          |

## ***LISTA DE FIGURAS***

|                                                                       |    |
|-----------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1</b> - Biossíntese de ácidos graxos e triacilglicerol..... | 05 |
| <b>Figura 2</b> - Oxidação de ácidos graxos.....                      | 06 |
| <b>Figura 3</b> - Biogênese de microRNAs.....                         | 08 |



## INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, as mudanças nos hábitos alimentares da população têm caracterizado novos padrões alimentares em todo o mundo. Essas mudanças, conhecidas como "transição nutricional", tiveram origem de um conjunto maior de alterações socioeconômicas e demográficas, reflexos da globalização e impactaram na qualidade alimentar, acarretando, de maneira geral, em um aumento no consumo de alimentos ricos em açúcares, carboidratos simples e refinados, redução no consumo de carboidratos complexos e fibras e, principalmente, um aumento excessivo no teor de gorduras da alimentação cotidiana. Concomitante a uma diminuição do requerimento da atividade física, essas mudanças nos hábitos alimentares fizeram com que a desnutrição, que acometia um grande número de pessoas, passasse a ser um problema secundário mas, ao mesmo tempo, trouxe uma grande preocupação com a incidência do sobrepeso e da obesidade (Popkin, 2001; Tardido e Falcão, 2006; Belahsen, 2014).

A obesidade é uma doença crônica não transmissível (DCNT), caracterizada pelo acúmulo excessivo de gordura corporal e é considerada um fator de risco para outras DCNT, tais como doenças cardiovasculares (DCV), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), desordens músculo-esqueléticas e alguns tipos de câncer (Ogunbode, 2011). Apesar de sua origem ser incerta, a obesidade tem causas multifatoriais e pode ser resultado de uma interação entre fatores genéticos, metabólicos, comportamentais e ambientais (Stein e Colditz, 2004).

Entre os anos de 1980 e 2008, a obesidade teve sua prevalência quase duplicada e estima-se que essa doença seja a causa principal de cerca de 2,8 milhões de mortes por ano (WHO, 2013). Dados epidemiológicos da Organização Mundial da Saúde de 2008, mostram que, de acordo com o índice de massa corporal (IMC), cerca de 1,4 bilhão de adultos apresentam sobrepeso ( $IMC \geq 25kg/m^2$ ) e, dentre esses, mais de 200 milhões de homens e 300 milhões de mulheres são obesos ( $IMC \geq 30kg/m^2$ ) (Lavie, De Schutter e Milani, 2014; WHO, 2013).

Por muitos anos, a obesidade apresentava-se como um problema apenas em países desenvolvidos e de alta renda, porém, nos dias de hoje, é considerada uma epidemia mundial, acometendo indivíduos de baixa a alta renda e de todas as faixas etárias (WHO, 2013).

O excesso de peso corpóreo durante a infância e adolescência predispõe o indivíduo a desenvolver obesidade e suas doenças relacionadas na vida adulta (Kopelman, 2000). A prevalência de sobrepeso e obesidade em crianças de 0 a 5 anos apresentou um aumento de cerca de 30% entre os anos de 1990 e 2012 e estima-se que, em 2025, serão mais de 70 milhões de crianças obesas no mundo (WHO, 2013).

Estudos epidemiológicos mostram que as mulheres fazem parte de um grupo mais vulnerável. Em 2010, mais de 50% das mulheres maiores de 15 anos apresentavam excesso de peso, sendo que, em alguns países, a prevalência de sobrepeso ou obesidade no sexo feminino chegava a 80% (WHO, 2013). Existe uma preocupação maior em relação a obesidade no sexo feminino já que, além de serem mais acometidas pela obesidade, o excesso de peso durante a gestação está associado a um aumento de riscos obstétricos, dentre eles o diabetes gestacional, hipertensão, pré-eclampsia e mortalidade neonatal (Castro e Avina, 2002; King, 2006). Além disso, sabe-se que filhos nascidos de mães obesas ou com sobrepeso apresentam maior risco de desenvolvimento de obesidade e doenças metabólicas na vida adulta (Oken et al., 2008).

Diversas pesquisas observacionais e experimentais têm buscado encontrar relação entre a nutrição materna e o impacto para o desenvolvimento e metabolismo dos filhos. Em 1976, Ravelli e colaboradores demonstraram a relação entre a privação de nutrientes durante a gestação com um aumento na incidência de obesidade e doenças cardiovasculares nos filhos adultos (Ravelli, Stein e Susser, 1976). Da mesma forma, estudos seguintes com humanos e modelos animais demonstraram que não só a privação de nutrientes, mas também a obesidade e o excesso no aporte de nutrientes durante a gestação, estavam relacionados com um maior risco de sobrepeso e obesidade na prole (Zambrano e Nathanielsz, 2013; Ojha et. al., 2013).



Tanto o desbalanço na ingestão de nutrientes como a composição corporal materna podem levar a um fenômeno conhecido como *imprinting* ou programação metabólica, processo em que condições adversas em um período crítico do desenvolvimento resultam em alterações permanentes na estrutura, fisiologia e metabolismo da progênie (Sullivan e Grove, 2010).

A obesidade materna está relacionada com uma inflamação sistêmica subclínica, caracterizada por um aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e acúmulo de macrófagos, mudanças que se estendem para a placenta. A placenta atua como mediadora e reguladora do metabolismo tanto para a mãe, como para o feto, sendo considerada um tecido vital durante o período gestacional. A gestação, por si só, também caracteriza um ambiente de inflamação sistêmica de baixo grau e, na presença de obesidade materna durante esse período, os níveis de citocinas pró-inflamatórias são exacerbados e o feto é exposto a um ambiente inflamatório, o que tem sido apontado como o possível mecanismo-chave para a manifestação de "fenótipos programados" (Segovia et al., 2014; Power e Schulkin, 2011).

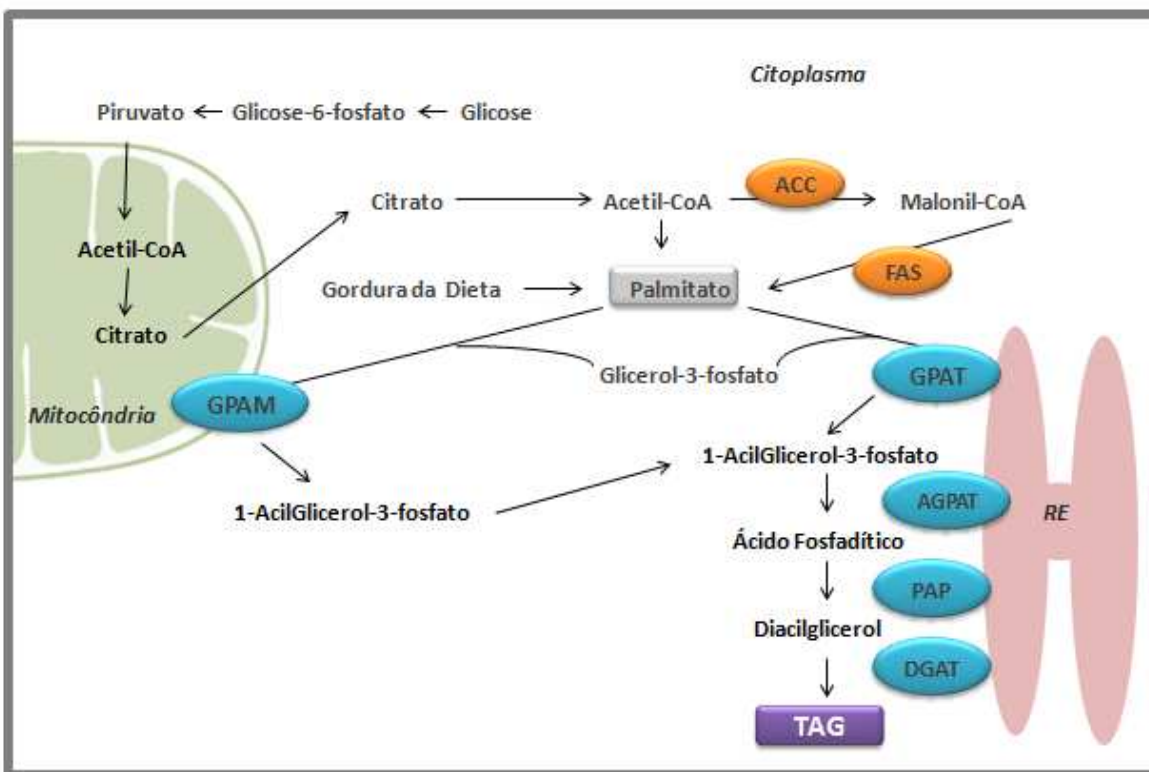
O consumo materno de dieta hiperlipídica (DH) durante a gestação e lactação induz na prole, além de um maior peso corpóreo e maior massa de tecido adiposo branco, um aumento de interleucina 1beta (IL1 $\beta$ ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) séricos, e níveis hipotalâmicos aumentados de fator nuclear kappa b (NFkB) e quinase c-Jun N-terminal fosforilada (p-JNK), proteínas sinalizadoras de processos inflamatórios (Ashino et al., 2012). A prole ainda apresenta marcadores de estresse de retículo endoplasmático no hipotálamo, ocasionando um acúmulo de proteínas mal formadas provocando, dessa forma, alterações no sistema nervoso central (SNC) e no balanço energético (Melo et al., 2014). A inflamação hipotalâmica e o estresse de retículo endoplasmático podem, por sua vez, levar a distúrbios no metabolismo de lipídios e na ação periférica da insulina e leptina (Purkayastha et al., 2011; Won et al., 2009) levando a desordens metabólicas em outros tecidos.

No fígado da prole de animais que consumiram DH durante a gestação e lactação, encontram-se aumentados os conteúdos de proteínas inflamatórias em sua forma ativa, tais como p-IKK, p-JNK e NFkB, tanto em animais recém-desmamados

como em animais adultos em consumo apenas de dieta controle (Benatti et al., 2014; Ashino et al., 2012), mostrando que a dieta e/ou a composição corporal materna durante a gestação e lactação predispõe a um ambiente inflamatório durante diferentes fases da vida da prole.

A obesidade gestacional também leva ao aumento no percentual de gordura corporal e resistência à ação da insulina, além de aumentar o conteúdo de triacilgliceróis (TAG) hepáticos, levando à riscos potencialmente elevados para o desenvolvimento de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) na prole (Shankar et al, 2008; Borengasser et al., 2011; Ashino et al., 2012). A DHGNA é a mais comum entre as doenças crônicas manifestadas no tecido hepático, caracterizada pelo acúmulo de gordura no fígado não resultante do consumo de bebidas alcoólicas, e tem sido considerada como a manifestação hepática da síndrome metabólica, um conjunto de fatores fisiológicos, bioquímicos, clínicos e metabólicos interligados que aumentam o risco de desenvolvimento de DCV, DM2 e diversas outras DCNT (Sofi e Casini, 2014; Kaur, 2014). Os mecanismos pelos quais a DHGNA é estabelecida ainda são alvo de estudos, mas sabe-se que o desbalanço na homeostase lipídica hepática pode ser causado por fatores como aumento na captação de ácidos graxos provenientes do tecido adiposo, aumento na síntese *de novo* de lipídios e diminuição na  $\beta$ -oxidação mitocondrial (Alfaradhi et al., 2014).

Foi demonstrado, em modelo de primatas não humanos e roedores, que a prole de mães obesas apresenta maior expressão hepática de genes como *Srebp1*, *Fas*, *Acc*, *Dgat*, *Agpat* e *Gpat* que, integradamente, participam da lipogênese e da síntese de TAG (Figura 1) (Thorn et al., 2014; Nicholas et al., 2014).

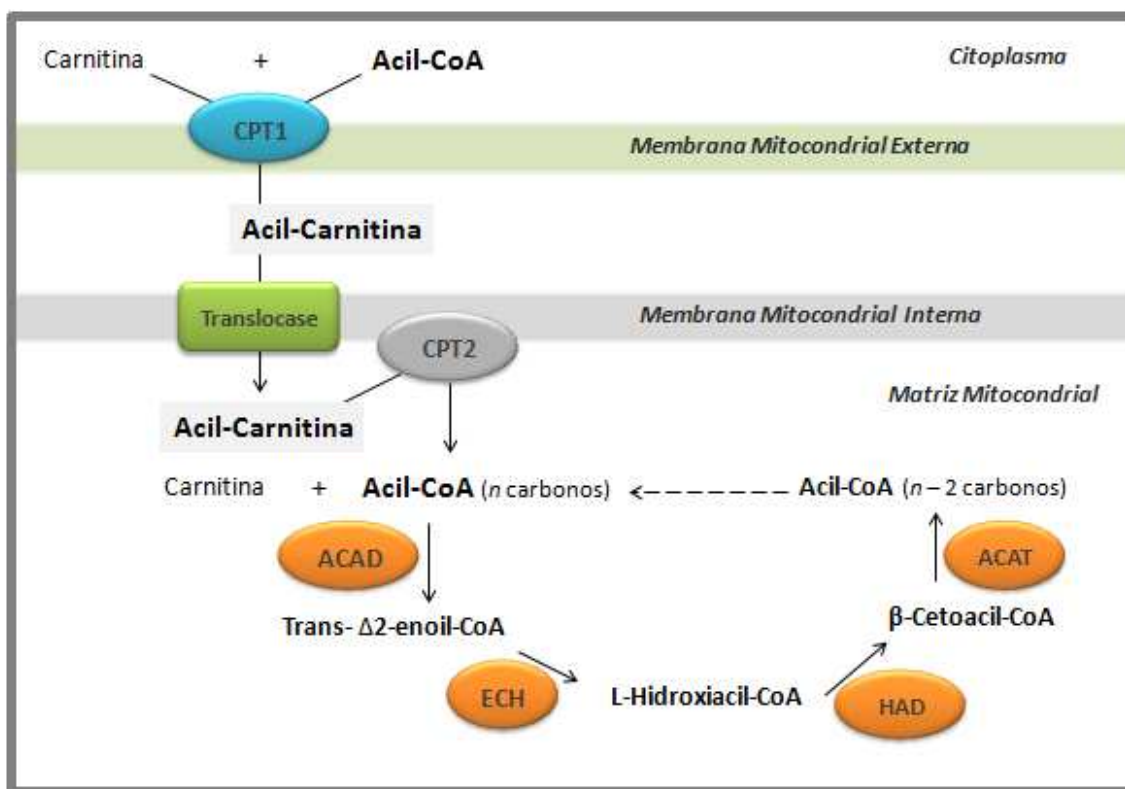


**Figura 1** - Biossíntese de ácidos graxos e triacilgliceróis

A *Srebp1* é uma enzima mediadora dos efeitos transcricionais ativados em resposta à ação da insulina e tem ação lipogênica por atuar como fator de transcrição para proteínas como *Fas* e *Acc* (Foufelle, Girard e Ferré, 1996). A *Acc* é uma enzima chave na biossíntese de ácidos graxos (AGs), catalisando a reação para a formação de malonil-CoA, que, por sua vez, serve de substrato para que a *Fas* atue na síntese do AG. Os AGs sintetizados a partir dessa via, assim como AGs provenientes da dieta e glicerol-3-fosfato, servem como substrato para síntese de TAG através das enzimas *Gpam* (*Gpat* mitocondrial), *Gpat*, *Agpat*, *Pap* e *Dgat*. Em um estudo recente, nosso grupo de pesquisas demonstrou que a prole recém-desmamada de mães alimentadas com DH durante a gestação e lactação apresenta maior expressão gênica de *Agpat* quando comparada à prole de mães que receberam dieta controle (Benatti et al., 2014).

Além de maior expressão de genes lipogênicos, a obesidade materna provoca na prole uma diminuição na atividade mitocondrial e na eficiência da oxidação de AGs (Alfaradhi et al., 2014; Nicholas et al., 2014).

A Carnitina-palmitoil transferase 1 (*Cpt1a*) e a Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (*Acadvl*) são enzimas que exercem funções importantes para a  $\beta$ -oxidação de ácidos graxos. Ácidos graxos de cadeia longa constituem a maior parte dos AGs disponibilizados para os tecidos e não são capazes de atravessar a barreira mitocondrial através de difusão simples, como os AGs de cadeia curta e média. Sendo assim, a *Cpt1a* é a enzima responsável por associar o grupo acil dos AGs à carnitina (acil-carnitina) para que sejam translocados do citosol para a matriz mitocondrial, onde terá início a  $\beta$ -oxidação (Bonfont et al., 2004). Já no interior da mitocôndria, a *Acadvl* catalisa a primeira reação de desidrogenação dos AGs (Figura 2) (Andresen et al., 1996).



**Figura 2** - Oxidação de ácidos graxos

Estudos recentes do nosso grupo demonstraram que essas duas importantes enzimas envolvidas na  $\beta$ -oxidação, *Cpt1a* e *Acadvl*, têm sua expressão diminuída no fígado da prole de mães obesas, logo após o desmame, dado esse que vai ao encontro ao resultado de outros trabalhos, que mostram diminuição de outros genes envolvidos na oxidação de AGs, tais como *Ppar* e *Pgc1 $\alpha$*  (Nicholas et al., 2014). Sendo assim, a diminuição da expressão de genes envolvidos na oxidação de ácidos graxos, concomitante com o aumento da expressão de genes envolvidos na síntese de TG, poderiam ser os fatores determinantes do maior acúmulo de TAG hepático, predispondo a prole ao desenvolvimento de DHGNA.

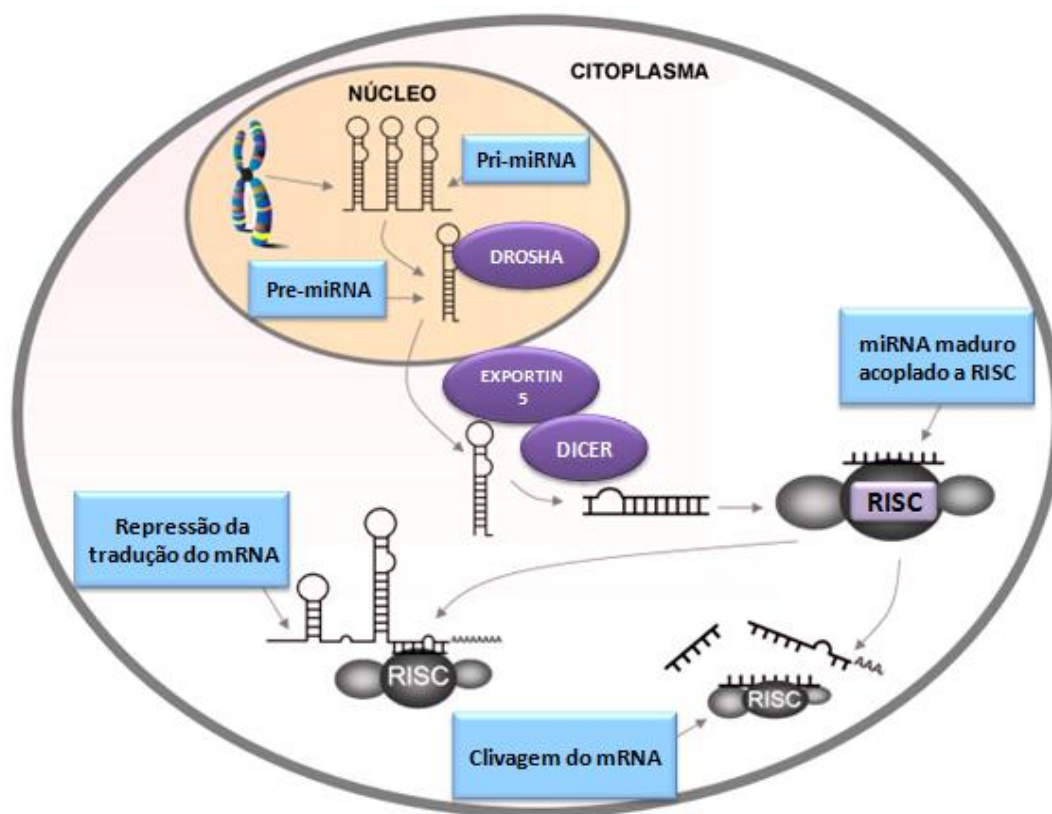
A origem molecular dessas alterações, transmitidas da mãe para o feto, ainda não é totalmente compreendida, mas estudos recentes têm apontado a epigenética como uma possível explicação para esses fenômenos.

A epigenética faz referência a uma variedade de processos regulatórios que influenciam o fenótipo e a expressão gênica em resposta à estímulos ambientais diversos, sem que haja alteração na sequência do DNA. Dentre os mecanismos epigenéticos, estão a metilação e a acetilação do DNA, modificação de histonas e a expressão de microRNAs (miRNAs) (Li, 2012).

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes, responsáveis pela regulação pós-transcricional. Em humanos, os miRNAs correspondem a 3% do total de genes descritos no genoma, representados por mais de 300 miRNAs identificados (Ambros, 2001; Ambros et al., 2003; Bentwich et al., 2005) e são responsáveis por controlar a atividade de cerca de 30% dos genes codificadores de proteínas (Ferland-McCollough et al., 2010).

A biogênese dos miRNAs (Figura 2) é semelhante a de outras moléculas de RNA, originando-se a partir da transcrição do DNA. O microRNA primário (Pri-miRNA) tem origem no núcleo da célula e é transcrito pela RNA polimerase II. Ainda no núcleo, o pri-miRNA é clivado por um complexo enzimático conhecido como Drosha, dando origem ao pré-miRNA, contendo cerca de 70 nucleotídeos. Os pré-miRNAs são exportados para o citosol por um fator de exportação nuclear, Exportin 5, onde sofrem

ação da Dicer, uma RNase endonuclease tipo III. O miRNA perde sua configuração em *hairpin* e são formadas duas fitas simples de miRNA maduro, com cerca de 20 a 22 nucleotídeos de extensão. A proteína agonauta, Ago2, é responsável por degradar uma das fitas de miRNA e, a fita única de miRNA madura acopla-se ao complexo RISC (complexo silenciador induzido por RNA). Em casos onde a fita de miRNA maduro acoplado ao RISC é pareada perfeitamente ao mRNA alvo, ocorre a clivagem do mesmo, mas, no caso dos mamíferos, o pareamento não é perfeito, o que levará a repressão da tradução do mRNA (Denli et al., 2004; Hammond et al., 2000).



**Figura 3 - Biogênese de microRNAs** (Adaptado de Thamilarasan et al., 2012)

No fígado, o microRNA mais expresso é o *miR-122*, totalizando cerca de 70% dos miRNAs expressos nesse tecido (Girardi et al., 2008). Esse microRNA tem sido descrito como importante regulador de diversos eventos no fígado, tais como: desenvolvimento e diferenciação dos hepatócitos, resposta ao stress, replicação dos

vírus da hepatite B e C, inflamação, fibrose, resposta à insulina, metabolismo lipídico e desenvolvimento de esteatose hepática e do carcinoma hepatocelular (Nakao et al., 2014, Yang et al., 2012, Hsu et al., 2012, Wen e Friedman 2012), porém, a função desenvolvida pelo miR-122 ainda é controversa.

Em um dos primeiros estudos utilizando-se um *antisense* para o *miR-122* em camundongos com obesidade induzida por dieta, Esau e colaboradores (2006) observaram uma diminuição nos níveis plasmáticos de colesterol, redução da expressão de alguns genes lipogênicos e aumento na oxidação de ácidos graxos. Em 2008, um estudo com primatas não humanos também encontrou relação entre a diminuição da expressão do *miR-122* e uma menor concentração de colesterol sérico (Elmén, 2008). Estudos mais recentes, com deleção a longo prazo desse microRNA no fígado, também demonstram redução nos níveis de colesterol séricos, no entanto, os efeitos observados no metabolismo lipídico no fígado são diferentes dos observados pelo silenciamento temporário (Hsu et al., 2012).

Hsu e colaboradores (2012) utilizaram um modelo animal de deleção genética total e fígado-específica de *miR-122* e observaram que, em ambos os casos, os animais desenvolvem esteatose e inflamação hepática, progredindo para DHGNA, fibrose e carcinoma hepatocelular. Essas alterações foram decorrentes de maior deposição de TAG hepático causada por um aumento na expressão de genes envolvidos na síntese de TAG nos animais deletados, tais como *Agpat*, *Mogat* e *Dgat*. Outro estudo recente também demonstrou que camundongos mutantes que não expressam *miR-122* desenvolvem esteato-hepatite, fibrose e carcinoma hepatocelular. Porém, interessante, quando reexpostos à expressão desse microRNA, apresentam melhora nas manifestações dessas doenças e na incidência dos tumores (Tsai, 2012).

Esses estudos evidenciaram uma relação direta entre o *miR-122* e a expressão de genes lipogênicos envolvidos, principalmente, com a síntese e armazenamento de TAG. Mas, além disso, existe também relação entre o *miR-122* e genes relacionados com a oxidação de AGs, por intermédio de outro microRNA, o *miR-370*. O *miR-370* é um microRNA que tem como alvo direto o gene da *Cpt1a* e, dessa

forma, quando expresso, inibe a oxidação de AG. Além disso, o *miR-370* atua como um inibidor do *miR-122* e, dessa forma, contribui também para o aumento da síntese e deposição hepática de TAG (Iliopoulos et al., 2010).

Além do *miR-370*, um outro fator importante que controla a transcrição e expressão do *miR-122* é o fator nuclear hepático 4 $\alpha$  (Hnf4 $\alpha$ ). O *miR-122*, em sua forma de microRNA primário, apresenta um sítio de ligação para o Hnf4 $\alpha$  em sua região promotora e, dessa forma, a expressão de Hnf4 $\alpha$  pode regular positivamente a expressão desse microRNA (Li, 2011). Nesse sentido, Yang e colaboradores (2012) demonstraram que, em células hepáticas que superexpressam JNK1, o Hnf4 $\alpha$  é inativado e, dessa forma, a expressão de *miR-122* é diminuída, ao passo que, quando as células são manipuladas para que haja um aumento na expressão de Hnf4 $\alpha$ , os níveis de *miR-122* são reestabelecidos.

Em um trabalho recente do nosso laboratório, foram analisados fragmentos do fígado de camundongos cujas mães eram obesas e ingeriram DH durante a gestação e lactação. Não encontramos diferença em relação à expressão e conteúdo proteico de Hnf4 $\alpha$  nesses animais em relação aos filhos de mães controle, porém pudemos observar uma diminuição na expressão de *miR-122* e aumento na expressão de *miR-370*, acompanhadas de alterações no metabolismo lipídico, como diminuição na oxidação de AGs e aumento na deposição de TAG hepático (Benatti, 2014).

As consequências da programação metabólica para o metabolismo da prole são bem estabelecidas, mas a importância da composição nutricional do leite materno não deve ser desconsiderada. Um alto consumo de gorduras durante o período de lactação altera a composição do leite materno, aumentando a disponibilidade de AGs para o feto e impactando negativamente nos níveis séricos de colesterol e triglicérides, peso corporal, adiposidade e capacidade termogênica (Priego et al., 2013). Porém, alguns trabalhos demonstraram que a obesidade materna durante o período gestacional, por si só, é capaz de promover alterações importantes para a prole (Wahlig, 2012), o que reforça a ideia de que o ambiente intra-uterino consiste em um período de grande importância para o desenvolvimento metabólico da prole.



Além de alterar o metabolismo da prole *in utero* e ao nascer, acredita-se que a exposição precoce ao excesso de nutrientes desencadeia uma maior sensibilidade à insultos pró-inflamatórios na vida adulta, tais como o consumo de DH. Glavas e colaboradores (2010) demonstraram que a prole de camundongos que obteve maior acesso ao leite materno, através da redução da ninhada, ao ser exposta à DH na vida adulta apresenta redução na sensibilidade hipotalâmica à leptina, menor sensibilidade à ação da insulina e maior ganho de peso. A obesidade materna durante a gestação e lactação também parece causar maior sensibilidade na prole quando exposta à DH na vida adulta, impactando em disfunção mitocondrial, alteração na expressão de genes lipogênicos e intolerância à glicose e à insulina (Bruce et al., 2009; Kruse et al., 2013).

Sendo assim, tendo em vista que o miR-122 parece estar envolvido em importantes mecanismos relacionados ao metabolismo lipídico e desenvolvimento de DHGNA, e que essa patologia tem estreita relação com obesidade e síndrome metabólica, nossa hipótese é que a obesidade materna pode reprogramar a expressão de *miR-122* na prole desde o nascimento até a vida adulta, predispondo ao maior acúmulo de TAG no fígado e induzindo uma “memória inflamatória” na prole, que responde de forma exagerada quando o insulto nutricional é repetido. Além disso, hipotetizamos que a prole pode ser diferentemente programada, dependendo do período a que a mãe foi exposta à dieta hiperlipídica (gestação ou lactação), levando ao desenvolvimento de distúrbios no metabolismo de lipídeos mais ou menos proeminentes, agudos ou mais duradouros.

## OBJETIVOS

### ***Objetivo Geral***

Investigar os efeitos da obesidade materna durante a gestação e/ou lactação sobre o metabolismo lipídico e expressão de *miR-122* na prole de camundongos.

### ***Objetivos Específicos***

- Avaliar o efeito isolado da gestação no metabolismo lipídico da prole de mães obesas;
- Avaliar os efeitos da obesidade materna durante a gestação e lactação, separadamente, sobre os efeitos no metabolismo lipídico da prole;
- Investigar se a obesidade materna durante a gestação e lactação leva a prole à maior sensibilidade aos efeitos da DH quando reexposta na fase adulta;
- Investigar, em prole de mães obesas durante a gestação e/ou lactação, a relação entre a expressão de *miR-122* e o metabolismo lipídico.

## CÁPITULO I

**Nutrition overload during gestation and lactation can independently alter lipid homeostasis in offspring and promote a deleterious response to an HFD in later life**

Simino, L.A.P.<sup>1</sup>; de Fante, T.<sup>1</sup>; Benatti, R.O.<sup>1</sup>; Fontana, M.<sup>1</sup>; Torsoni, M.A.<sup>1</sup>; Milanski, M.<sup>1</sup>; Velloso, L.A.<sup>2</sup>; Torsoni, A.S.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Aplicadas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Limeira, São Paulo, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Interna, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, Campinas, São Paulo, Brasil

Key words: epigenetic, lipid metabolism, metabolic programming, high-fat diet

\*Correspondence address:

Adriana S. Torsoni

Faculdade de Ciências Aplicadas - Universidade de Campinas

Rua Pedro Zaccaria, 1300 - Jardim Santa Luiza

Limeira-São Paulo

CEP 13484350

Phone: 55 19 3701 6705

Fax: 55 19 3701 6680

E-mail: [adriana.torsoni@fca.unicamp.br](mailto:adriana.torsoni@fca.unicamp.br)

## Abstract

Nutritional status in early life plays a critical role in the metabolic phenotype of offspring, and contribution of the pre- or post-natal period needs to be better understood. Here we evaluated whether maternal HFD consumption during gestation or lactation can affect lipid metabolism and lead to a deleterious response to an HFD in offspring. Newborn pups (d0) from obese dams showed a decrease in *Cpt1a/Acadvl*, an increase in *Agpat/Gpam* and a decrease in *miR-122* hepatic expression. Pups fostered by chow dams presented an increase in body weight and *Agpat/Gpam* expression on d28. At d82, re-exposure to an HFD resulted in higher body weight and hepatic lipid content, decreased *Cpt1a/Acadvl* expression, increased *Agpat/Gpam* expression and decreased *miR-122* hepatic expression and p-HSL in WAT. Our data suggests that gestational overnutrition results in metabolic changes that can permanently alter lipid homeostasis and lead to a more harmful response to an HFD in offspring.

## 1. Introduction

Various studies have shown that nutritional status in early or pre-natal life plays a critical role in susceptibility to cardiovascular and metabolic diseases such as hypertension, dyslipidaemia, hyperglycaemia and obesity (Waterland and Garza, 1999; Vogt et al., 2014). These factors together characterize the metabolic syndrome. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is considered to be a hepatic manifestation of this condition (Angulo, 2007; Bugianesi et al., 2010).

The liver plays a central role in modulating lipid metabolism and glucose homeostasis; disturbance of lipid metabolism and insulin signalling is frequently associated with NAFLD (Samuel et al., 2004). Fatty liver is caused by an imbalance in lipid metabolic pathways involved in triacylglycerol delivery, synthesis, export and oxidation (Yamaguchi et al., 2007).

Maternal body weight gain and HFD consumption during critical phases of offspring development result in greater adiposity and body weight, increased liver triglyceride deposition and insulin resistance (Samuelsson et al., 2008; Elahi et al., 2009; Ashino et al., 2012; Heerwagen et al., 2013). Moreover, offspring exposed to an HFD *in utero* and through lactation present impaired hepatic mitochondrial function and up-regulation of lipogenesis, contributing to

the development and progression of NASH (Bruce et al., 2009).

According to Heerwagen and colleagues (2010), since lipids can act as transcriptional activators and signalling molecules, foetal and neonatal exposure to lipid overload can trigger epigenetic mechanisms that regulate genes involved in lipid sensing and metabolism. MicroRNA (miR) are known epigenetic modulators of gene expression (Rottiers and Naar, 2012; Ha and Kim, 2014), and *miR-122* and *miR-370* are involved in the modulation of hepatic lipid metabolism (Iliopoulos et al., 2010; Li et al., 2011; Hsu et al., 2012; Tsai et al., 2012; Wen and Friedman, 2012; Yang et al., 2012; Benatti et al., 2014; Nakao et al., 2014). *miR-122* is expected to modulate lipogenic genes and to be potentially targeting of *miR-370*, which could directly downregulate the expression of the carnitine palmitoyltransferase 1 $\alpha$  gene (Iliopoulos et al., 2010; Li et al., 2011). In a recent study, maternal HFD consumption and obesity reduced hepatic expression of *miR-122* and increased expression of *miR-370* in recently weaned mice (Benatti et al., 2014). These effects were associated with higher expression of lipogenic genes (*Gpam*, *Agpat* and *Scd1*) and lower expression of genes related to fatty acid oxidation (*Cpt1a* and *Acadvl*) (Benatti et al., 2014).

Although previous results have shown that miRNAs may be involved in the genesis of metabolic damage associated with fatty liver in offspring of obese dams, the role of gestation and lactation in these effects is still controversial.

Lean offspring suckled by obese dams in models of cross-fostering showed increased body weight and food consumption with a dysmetabolic phenotype, evidenced by increased plasma insulin and leptin and NAFLD in adulthood (Oben et al., 2010). On the other hand, some authors claim that health in adulthood is primarily determined by the conditions under which an organism develops in the womb. Gniuli and colleagues showed that exposure to an HFD *in utero* may lead to a type 2 diabetes phenotype that could be transmitted to the progeny (Gniuli et al., 2008). Maternal consumption of an HFD during gestation may also cause dysregulation of triglyceride metabolism, enhancement of leptin expression and suppression of adiponectin expression in adipose tissues through epigenetic modifications in offspring, thus causing a metabolic syndrome-like phenomenon (Masuyama and Hiramatsu, 2012).

Some studies have shown that offspring of dams fed an HFD exhibit premature leptin and insulin resistance that persists into adulthood, despite being maintained on a healthy standard chow (SC) diet (Glavas et al., 2010; Ashino et al., 2012). In addition, Glavas and colleagues

(2010) showed that offspring of dams fed an HFD exhibit reduced hypothalamic sensitivity to leptin and increased body weight after a re-exposure to an HFD in adult life. However, the effect of re-exposure to an HFD in adult life on hepatic lipid metabolism and fatty liver needs to be clarified.

In the present study, we investigated the contribution of maternal HFD consumption during gestation and lactation on hepatic lipid metabolism disturbance observed in offspring. Moreover, we investigated whether early overnutrition leads to a more harmful response to an HFD in offspring adulthood.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Animals**

Ten 5-week-old virgin female and ten male Swiss mice (*Mus musculus*) at same age were obtained from the Animal Breeding Center at University of Campinas (Campinas, São Paulo, Brazil) for mating. The females were randomly fed either an HFD or SC *ad libitum* for adaptation for 3 weeks before mating and filtered water *ad libitum*. The HFD was prepared according to AIN-93G modified for high fat (45%) content, according to Benatti et al. (2014; Table 1).

The adult males were fed only SC during the adaptation period. Mating was performed by housing the females with the males for 3 days. Pregnancy was confirmed by examination of vaginal smears for the presence of sperm.

Pregnant females were maintained in individual polypropylene micro-isolators, with a bed of autoclaved pinewood, at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and lights on from 06.00 to 18.00 hours. Their diet (HFD or SC) during gestation was the same as that before mating.

On the day of birth (d0), litters were divided in two groups according to the maternal diet: offspring from the female mice fed SC were included in the C group and those from the female mice fed an HFD were included in the H group. Some litters were euthanized and used for d0 analysis. The remaining litters were adjusted to eight pups each to ensure a standard litter size per mother.

To study the effect of maternal exposure to an HFD on offspring during gestation or lactation, the following protocol was carried out. On the first post-partum day (d0), individual pups from the litters were randomly assigned to two different foster conditions: (a) unfostered (i.e. the pups were fed by their own mother) and (b) cross-fostered (i.e. the pups were fostered by a mother from the other group). Four groups were obtained: CC and HH, in which the pups were exposed to SC or an HFD during gestation and lactation, respectively, and HC and CH, in which the pups were exposed to an HFD only during gestation or only during lactation, respectively.

All the pups were weaned on day 18 and separated according to sex. Only males were used. The cross-fostered (CH and HC) and unfostered (CC and HH) groups were fed SC after weaning until experimental day 28 (d28).

The other pups in the litters either remained on SC after weaning until day 82 (CC and HH) or on SC after weaning until day 42, when they were exposed to an HFD until day 82 (CC–HF and HH–HF). Body weights were measured once weekly, and at d82, the mice were sacrificed by decapitation.

The total number of animals used in each experiment is mentioned in the figure legends.

All experiments were performed in accordance with the recommendations of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) guidelines and approved by the Ethical Committee for Animal Use, Protocol no. 3175-1, from the State University of Campinas - UNICAMP (Campinas, São Paulo, Brazil).

## **2.2 Biochemical Analysis**

To evaluate triglycerides and cholesterol, blood samples were collected on the experimental days (after overnight fasting) and centrifuged. By enzymatic colorimetry, serum aliquots were used to measure the levels of TAG [glycerol-3-phosphate oxidase–phenol + aminophenazone (GPO-PAP); Roche Diagnostics, Basel, Switzerland] and cholesterol [cholesterol oxidase–phenol + aminophenazone (CHOD-PAP); Roche Diagnostics, Basel, Switzerland].

The hepatic lipid content was evaluated as proposed by Folch and colleagues (1957). In brief, tissue was homogenized with chloroform/methanol (2:1). The homogenate was filtrated and the liquid phase was washed with 0.9% NaCl solution. The mixture was centrifuged to separate the

two phases. The lower chloroform phase was made to evaporate and the lipid content was measured.

### 2.3 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Total hepatic RNA was extracted using TRIzol reagent (Life Technologies Corporation, CA, USA) according to the manufacturer's recommendations and was quantified using NanoDrop ND-2000 (Thermo Electron, WI, USA). Reverse transcription was performed with 3 ng of total RNA, using a high-capacity cDNA reverse transcription kit (Life Technologies Corporation, CA, USA). Relative expression was determined using a Taqman detection system and primers for the target genes: Mm 00479699\_g1 1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (*Agpat1*); Mm 00444293\_m1 acyl-CoA dehydrogenase, very long chain (*Acadvl*); Mm 01231183\_m1 carnitine palmitoyltransferase 1a (*Cpt1a*), Mm 00833328\_m1 glycerol-3-phosphate acyltransferase (*Gpam*) (Life Technologies Corporation, CA, USA). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*Gapdh*) was used as the endogenous control (4352339E mouse GAPD; Life Technologies Corporation, CA, USA).

Each PCR contained 20 ng of complementary DNA. Real-time PCR was performed on an ABI Prism 7500 Fast platform. Data were analysed using the sequence detection system 2.0.5 (Life Technologies Corporation, CA, USA) and expressed as relative values determined by the comparative threshold cycle (Ct) method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), according to the manufacturer's recommendation.

### 2.4 miR Purification and Quantification

The miR content was extracted and purified from the liver of the mice using the mirVana miRNA isolation kit (Life Technologies Corporation, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The relative expression of *miR-122* was determined using primers with a TaqMan detection system (ID 002245, Life Technologies Corporation) and *U6 spliceosomal RNA* (ID 001973) as endogenous controls (Life Technologies Corporation, CA, USA). Gene expression was accessed by real-time PCR performed on the ABI Prism 7500 Fast platform.

Gene expression by real-time PCR was analysed on the ABI Prism 7500 Fast platform. The data were analysed using the sequence detection system 2.0.5 (Life Technologies Corporation, CA, USA) and expressed as a relative value using the comparative threshold cycle (Ct) method ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), according to the manufacturer's recommendation.



## 2.5 Immunoblotting

Tissue samples (liver and white adipose tissue) were obtained and homogenized in freshly prepared ice-cold buffer [1% (v/v) Triton X-100, 0.1 mol L<sup>-1</sup> Tris, pH 7.4, 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium pyrophosphate, 0.1 mol L<sup>-1</sup> sodium fluoride, 0.01 mol L<sup>-1</sup> EDTA, 0.01 mol L<sup>-1</sup> sodium vanadate, 0.002 mol L<sup>-1</sup> PMSF and 0.01 mg aprotinin/mL]. The insoluble material was removed by centrifugation (10 000 ×g) for 25 min at 4°C. The protein concentration in the supernatant was determined using the Bradford dye-binding method. The supernatant was re-suspended in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min before separation by SDS-PAGE using a miniature slab gel apparatus (Bio Rad, Richmond, CA, USA). Proteins from the gel were electrotransferred to nitrocellulose for 90 min at 120 V (constant). The nitrocellulose blots were probed with specific antibodies. ACADVL (SC-376239) was obtained from Santa Cruz (Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA). Phospho-HSL<sup>Ser565</sup> (#4137) was obtained from Cell Signaling (Cell Signaling Technology Inc). In addition,  $\alpha$ -tubulin (T-9026) was obtained from Sigma (Sigma-Aldrich Co.).

Subsequently, the blots were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (KPL, Gaithersburg, MD, USA). The signal was detected by chemiluminescence using the Amersham ECL kit (RPN 2232, Buckinghamshire, UK) and subsequent exposure to a Kodak XAR film. Band intensities were quantified by optical densitometry of developed autoradiographs (Scion Image software, ScionCorp, MD, USA), and the intensities of the bands were normalized to those of the loading control  $\alpha$ -tubulin.

## 2.6 Statistical Analysis

Numeric results are expressed as means with their standard errors of the indicated number of experiments. Student's t-tests were used for unpaired samples and analysis of variance (ANOVA) was used for multiple comparisons. A post-hoc test (Bonferroni) was used for determining a significance level of  $p < 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1 Offspring exposure to maternal obesity throughout gestation induced molecular evidence of decrease in fat oxidation in the liver through epigenetic modulation in newborn mice

The serum CHO and TAG levels in the C and H group mice on d0 were the same; however, after weaning (d28), CHO and TAG increased in HH (1.3-fold). Furthermore, among the cross-fostered mice, when compared with CH, HC showed an increase in the CHO and TAG levels (1.3-fold to CHO and 1.5-fold to TAG) (Table 2). In adulthood (d82), there was no difference in the CHO and TAG levels between CC and HH. However, the re-exposure to an HFD increased the CHO levels in both groups (CC–HF and HH–HF), but the effect was more pronounced in HH–HF (1.3-fold compared to SC–OR; Table 3). The serum TAG levels were same among CC, HH and CC–HF, but increased in HH–HF (2.1-fold) compared to SC–OR.

To evaluate whether maternal HFD consumption during gestation leads to alteration in metabolic pathways related to liver fatty acid oxidation and lipogenesis in offspring, we performed analyses in mice on the day of delivery (d0). We observed that mice of dams fed an HFD during gestation had reduced gene expression to *Cpt1a* (38.5-fold) and *Acadvl* (5.6-fold; Fig. 1B) as well as a lower level of ACADVL protein (87%; Fig. 1C). An increase in the expression of *Atpat* (1.3-fold) and *Gpam* (1.9-fold; Fig. 1D) was also identified in offspring of obese dams. Maternal consumption of an HFD during gestation led to a decrease in *miR-122* expression (50%; Fig. 1E).

### **3.2 Offspring exposure to maternal obesity throughout gestation and/or lactation induced altered expression of key hepatic genes involved in fatty acid oxidation and triglyceride synthesis through epigenetic modulation**

To assess the role of gestation and lactation in the hepatic metabolic disturbance described previously, we fostered pups after birth. We found that mice gestated by dams fed an HFD but suckled by a lean dam (HC) gained more weight (1.2-fold) than those gestated by lean dams but suckled by dams fed an HFD (CH). The lactation period did not have an effect on body weight since CH showed similar body weight to CC (Fig. 2A).

Interestingly, *Cpt1a* expression in HH (d28) was reduced (46%) compared with that in CC. Mice suckled by dams fed an HFD (CH) showed increased, but not significant, *Cpt1a* expression. However, when the mice were gestated by dams fed an HFD and suckled by lean dams (HC), the expression level was similar to that in unfostered mice exposed to SC (CC) (Fig. 2B). *Acadvl* expression significantly reduced in HH (35%), as well as protein content of ACADVL tended to be lower in the group HH (Fig. 2C); the expression in the cross-fostering groups (CH and HC) was similar to that in HH (Fig. 2B). We also evaluated the relative expression of

lipogenic genes (*Agpat* and *Gpam*). As seen in Fig. 2D, compared with CC, both genes significantly increased in HH (62% and 33%, respectively), CH (87% and 38%, respectively) and HC (164% and 62%, respectively) (Fig. 2D). *miR-122* expression significantly reduced in HH (1.5-fold), CH (2.2-fold) and HC (2.1-fold) compared with that in CC (Fig. 2E). Compared with CC, HH showed reduced phosphorylation (62%) in the inhibitory amino acid residue (Ser565) of hormone-sensitive lipase (HSL). The phosphorylation in the cross-fostered mice (CH and HC) was similar to that in unfostered mice exposed to an HFD (HH) (Fig. 2F).

### 3.3 Re-exposure of offspring of obese dams induced molecular evidence of higher sensitivity to an HFD in adulthood

To evaluate whether HFD exposure in early life would increase HFD sensitivity in later life and consequently affect lipid metabolism in offspring, we used a model in which offspring of obese and lean dams were re-exposed to an HFD at 6 weeks of age.

We initially evaluated the body weight after re-exposure to an HFD over 5 weeks. As shown in Fig. 3A, re-exposed CC (CC–HF) and HH (HH–HF) were slightly heavier (reaching 1.5-fold and 1.4-fold, respectively, by the end of treatment) than CC and HH when maintained on SC. However, the weight gain of HH–HF was significantly higher than that of CC–HF (35% from week 2 of exposure to an HFD; inserted Fig. 3A).

In addition to altered serum lipids in CC–HF and HH–HF compared with CC and HH (Table 3), the hepatic lipid content also increased in HH (10.6%) and HH–HF (22.7%) compared with CC and CC–HF, respectively (Fig. 3B).

Remarkably, HH–HF exhibited attenuation in hepatic *Cpt1a* and *Acadvl* gene expression compared with CC–HF, paralleled by decrease in the ACADVL protein level in HH–HF (Fig. 3C and D). In contrast to that in CC, re-exposure to an HFD in HH induced a marked increase in hepatic *Agpat* (3.4-fold) and *Gpam* (2.6-fold) gene expression (Fig. 3E). The hepatic *miR-122* content during adulthood was reduced in HH (41%) compared with CC during adulthood. However, re-exposure to an HFD further reduced the *miR-122* content in both groups (CC–HF and HH–HF; Fig. 3F).

Phosphorylation of HSL (Ser565) in white adipose tissue was investigated after re-exposure to an HFD. As shown in Fig. 3G, in CC–HF, the phosphorylation level was similar to that in CC

and HH. However, in HH–HF, the phosphorylation level was significantly reduced (more than 80%) compared with the control group (CC).

#### 4. Discussion

Development of metabolic disorders in offspring as a result of dysfunctional maternal nutrition is already acknowledged in the literature. Important alterations in glucose and lipid metabolism can be observed in recently weaned and adult offspring of obese dams (Gniuli et al., 2008; Heerwagen et al., 2010; Oben et al., 2010; Masuyama and Hiramatsu, 2012). In this context, we have recently shown that maternal consumption of an HFD during gestation and lactation periods affects lipid metabolism, active inflammatory pathways and proteins related to unfolded protein response in offspring (Ashino et al., 2012; Benatti et al., 2014; Melo et al., 2014). Maternal consumption of an HFD promotes downregulation of hepatic  $\beta$ -oxidation-related genes and upregulation of genes involved in lipid synthesis in offspring (Benatti et al., 2014). These alterations seem to be driven by modulation of *miR-122* and *miR-370* expression, causing metabolic adaptations that lead to increased ectopic lipid accumulation within the liver.

However, only few studies have tried to explain the relative contribution of pre- or post-natal maternal HFD consumption on the metabolic phenotype in offspring. Sun and colleagues (2012) showed that maternal HFD consumption during suckling has a greater influence in determining leptin-signaling impairment in offspring. On the other hand, Cerf and colleagues (2005) showed that neonates exposed to an HFD only during foetal life presented reduced b-cell volume and number, accompanied by sustained and irreversible hyperglycaemia during adulthood. The authors also believe that a dietary insult occurring during early infancy can be considered an additional stimulus, which worsens an already compromised b-cell function.

Here, to investigate the role of maternal consumption of an HFD on hepatic lipid metabolism, either during gestation or lactation, we initially evaluated newborn offspring (d0). Pups (d0) showed increased *Acp1a* and *Gpam* expression and decreased *Cpt1a* and *Acadvl* expression. These results suggest that pre-natal maternal HFD consumption is sufficient to promote significant alterations in the triacylglycerol and fatty acid oxidation pathways. In our study, H presented lower levels of hepatic *miRNA-122* than C, indicating the influence of maternal HFD consumption during gestation on lipid metabolism in offspring. *miRNA-122* has an important role

in liver homeostasis (Li et al., 2011; Hsu et al., 2012; Tsai et al., 2012; Wen and Friedman, 2012; Yang et al., 2012; Benatti et al., 2014; Nakao et al., 2014). Mice lacking the gene encoding *miR-122a* are viable but develop temporally controlled steatohepatitis, fibrosis and hepatocellular carcinoma (Hsu et al. 2012; Tsai et al., 2012). Besides this, mice present hepatic infiltration of inflammatory cells that produce pro-tumorigenic cytokines, including IL-6 and TNF $\alpha$  (Hsu et al., 2012). Thus, considering the importance of lipid metabolism and inflammatory signalling to the development of hepatic steatosis, maternal HFD consumption during gestation was sufficient to modulate the hepatic metabolic pathway, leading to liver damage in newborn mice.

The influence of maternal nutritional status during gestation on lipid metabolism was re-enforced by the results observed in newly weaned offspring (d28) using the cross-fostering model. Our results showed that pups cross-fostered by SC dams (HC) presented higher body weight and *Agpat* and *Gpam* expression in the liver, accompanied by decrease in hepatic *Acadvl* expression and HSL phosphorylation (Ser565) in WAT, compared with unfostered mice exposed to SC (CC). Although body weight was not different between CC and pups cross-fostered by dams fed an HFD, they presented a metabolic phenotype similar to that of HC, but with lower magnitude. These results suggest that the gestational period has a greater influence on liver lipid homeostasis than the suckling period. Furthermore, we observed that *miR-122* expression in the liver decreased in both groups, mice cross-fostered by dams fed an HFD (CH) and mice cross-fostered by dams fed SC (HC), suggesting that the presence of fatty acid in either maternal blood or milk could contribute to inhibition of *miR-122* expression. This hypothesis was re-enforced when we analysed adult mice after re-exposure to an HFD (HH–HF and CC–HF). The *miR-122* expression in both groups was lower than that in CC. We did not evaluate the milk composition; however, previous studies demonstrated that HFD consumption altered the fatty acid composition of human and rat milk (Silber *et al.*, 1988; Priego *et al.*, 2013). Besides, in rats, HFD consumption during gestation increases the placental and blood TG levels (Shankar et al., 2011).

Interestingly, any one additive effect was observed in the mice of dams fed with an HFD during gestation and lactation. Gluckman and Hanson (2004) suggested that a mismatch between the pre- and post-natal environment results in inappropriate adaptations and subsequent metabolic disease, also known as the predictive adaptive response (PAR) hypothesis.

Metabolic modification in adult life promoted by maternal HFD consumption can be attributed to epigenetic modifications of DNA. These modifications are stable and can be transmitted to progeny, thus affecting gene expression. Here we did not find differences in liver *Cpt1a*, *Agpat* and *Gpam* expression and the p-HSL level in WAT between CC and HH. However, for most parameters evaluated, the re-exposure to an HFD during adult life was more harmful to offspring of the obese dams than to offspring of lean dams. In accordance with our results Glavas and colleagues (2010) and Kruse and colleagues (2013) showed that, in mice, perinatal nutritional overload leads to a more deleterious response to an HFD challenge later in life, even after an interval of normal diet. Taken together, our results suggest that exposure to high levels of nutrients during early stages of development (gestation and lactation) induces a metabolic adaptation that results in an inappropriate response to nutritional overload in later stages of life.

In summary, maternal HFD consumption during gestation and lactation seems to affect the metabolic phenotype in offspring. The presence of fatty acids in maternal milk and blood can be responsible for modulating the expression of *miR-122*, which is involved in liver homeostasis. Nutritional overload during gestation and lactation have different effects on protein expression and lipid synthesis in offspring after weaning. However, the gestational period is responsible for promoting a greater modification in the phenotype compared with the lactational period. Interestingly, these modifications in the phenotype are not observed in adult life but seem to cause a more harmful response to an HFD challenge later in life. These findings provide important information regarding the effects of maternal nutrition and obesity on the metabolic phenotype of offspring, especially during gestation. However, further studies are necessary to evaluate how nutritional intervention during gestation and lactation could contribute to reduction in metabolic damage in offspring.

## 5. Acknowledgments

The study was supported by grant #2011/22156-7 and #2013/07607-8, São Paulo Research Foundation (FAPESP). The contributing authors report no conflict of interest.

## 6. References

Angulo P. 2007 Obesity and nonalcoholic fatty liver disease. *Nutr Rev.* 65 (6Pt 2), 57-63.

Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, Torsoni AS, Torsoni MA, 2012. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J Nutr Biochem.* 23, 341-348.

Benatti RO, Melo AM, Borges FO, Ignacio-Souza LM, Simino LA, Milanski M, et al., 2014. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. *Br J Nutr.* 111(12), 2112-22.

Bugianesi E, Moscatiello S, Ciaravella MF, Marchesini G. 2010. Insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Curr Pharm Des.* 16(17), 1941-51.

Bruce KD, Cagampang FR, Argenton M, Zhang J, Ethirajan PL, Burdge GC et al., 2009. Maternal high-fat feeding primes steatohepatitis in adult mice offspring, involving mitochondrial dysfunction and altered lipogenesis gene expression. *Hepatology.* 50(6), 1796-808.

Cerf ME, Williams K, Nkomo XI, Muller CJ, Du Toit DF, Louw J, Wolfe-Coote SA, 2005. Islet cell response in the neonatal rat after exposure to a high-fat diet during pregnancy. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 288(5), R1122-8.

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

Folch J, Lees M, Stanley GHS, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 226, 497–509.

Gniuli D, Calcagno A, Caristo ME, Mancuso A, Macchi V, Mingrone G, Vettor R, 2008. Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. *J Lipid Res.* 49, 1936–1945.

Gluckman PD, Hanson MA. 2004. The developmental origins of the metabolic syndrome. *Trends Endocrinol. Metab.* 15, 183–187.

Ha M, Kim VN, 2014. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15(8), 509-24.

Heerwagen MJ, Miller MR, Barbour LA, Friedman JE, 2010. Maternal obesity and fetal metabolic programming: a fertile epigenetic soil. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 299(3), R711-

22.

Heerwagen MJ, Stewart MS, de la Houssaye BA, Janssen RC, Friedman JE, 2013. Transgenic increase in N-3/n-6 Fatty Acid ratio reduces maternal obesity-associated inflammation and limits adverse developmental programming in mice. *PLoS One*. 8, e67791.

Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, et al., 2012. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*. 122, 2871-2883.

Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI, 2010. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1alpha and affects lipid metabolism. *J Lipid Res*. 51, 1513-1523.

Kruse M, Seki Y, Vuguin PM, Du XQ, Fiallo A, Glenn AS, 2013. High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. *Endocrinology*. 154, 3565-76.

Li ZY, Xi Y, Zhu WN, Zeng C, Zhang ZQ, Guo ZC, 2011. Positive regulation of hepatic miR-122 expression by HNF4alpha. *J Hepatol*. 55, 602-611.

Masuyama H, Hiramatsu Y, 2012. Effects of a high fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expressions. *Endocrinology*. 153, 2823–2830.

Melo AM, Benatti RO, Ignacio-Souza LM, Okino C, Torsoni AS, Milanski M et al., 2014. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism*. 63, 682-92.

Nakao K, Miyaaki H, Ichikawa T. 2014. Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 49(4), 589-93.

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

Oliveira MC, Menezes-Garcia Z, Henriques MC, Soriani FM, Pinho V, Faria AM et al., 2010. Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology*. 151, 1598-1610.



Priego T, Sánchez J, García AP, Palou A, Picó C, 2013. Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. *Lipids*. 48, 481-495.

Rottiers V, Näär AM, 2012. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 13(4), 239-50.

Samuel VT, Liu ZX, Qu X, Elder BD, Bilz S, Befroy D, et al., 2004. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem*. 279(31), 32345-53.

Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH et al., 2008. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*. 51(2), 383-92.

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

Silber GH, Hachey DL, Schanler RJ, Garza C, 1988. Manipulation of maternal diet to alter fatty acid composition of human milk intended for premature infants. *Am J Clin Nutr*. 47, 810-814.

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

Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, et al., 2012. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest*. 122, 2884-2897.

Vogt MC, Paeger L, Hess S, Steculorum SM, Awazawa M, Hampel B, et al. 2014. Neonatal insulin action impairs hypothalamic neurocircuit formation in response to maternal high-fat feeding. *Cell*. 156, 495-509.

Waterland RA, Garza C. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr*. 69,179-197.

Wen J, Friedman JR, 2012. miR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor suppression. *J Clin Invest*. 122(8):2773-6.

Yamaguchi K, Yang L, McCall S, Huang J, Yu XX, Pandey SK, Bhanot S, Monia BP, Li YX,

Diehl AM, 2007. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 45(6), 1366-74.

Yang YM, Seo SY, Kim TH, Kim SG, 2012. Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid. *Hepatology*. 56, 2209-2220.

## Tables and Figures

**Table 1.** Nutritional composition of the standard chow and experimental diets fed to mice during gestation, lactation and adult life

|                    | Chow Diet * | Growth HFD | Maintenance HFD |
|--------------------|-------------|------------|-----------------|
| Net Protein (g%)   | 20,0        | 23,3       | 16,7            |
| Fat Content (g%)   | 4,0         | 24,0       | 24,0            |
| Carbohydrates (g%) | 65,95       | 42,1       | 49,3            |
| Fiber (g%)         | 5,0         | 5,55       | 5,0             |
| Mineral Mix (g %)  | 3,5         | 3,5        | 3,5             |
| Vitamin Mix (g %)  | 1,0         | 1,0        | 1,0             |
| Choline            | 0,25        | 0,25       | 0,25            |
| Cystine            | 0,3         | 0,3        | 0,25            |
| Total              | 100,0       | 100,0      | 100,0           |
| Energy (KJ/g)      | 14,6        | 19,3       | 19,3            |

\* NUVILAB® Cr-1; Nuvital.

**Table 2.** Lipid profile of offspring at d0 and d28

|                     | d0            |               | d28           |               |               |               |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                     | C             | HF            | CC            | CH            | HH            | HC            |
|                     | Mean with SEM |               | Mean with SEM |               |               |               |
| <b>CHO (mmol/L)</b> | 2.39 ± 0.15 a | 2.75 ± 0.48 a | 2.22 ± 0.13 a | 2.20 ± 0.13 a | 3.04 ± 0.17 b | 2.98 ± 0.08 b |
| <b>TAG (mmol/L)</b> | 0.64 ± 0.05 a | 0.58 ± 0.08 a | 0.59 ± 0.00 a | 0.97 ± 0.09 c | 1.62 ± 0.16 b | 1.52 ± 0.12 b |

Values are mean ± SEM from 6 pups per group.

CHO, serum cholesterol; TAG, serum TAG.

Different letters indicate statistical significance between groups of the same experimental day ( $p \leq 0.05$ ).

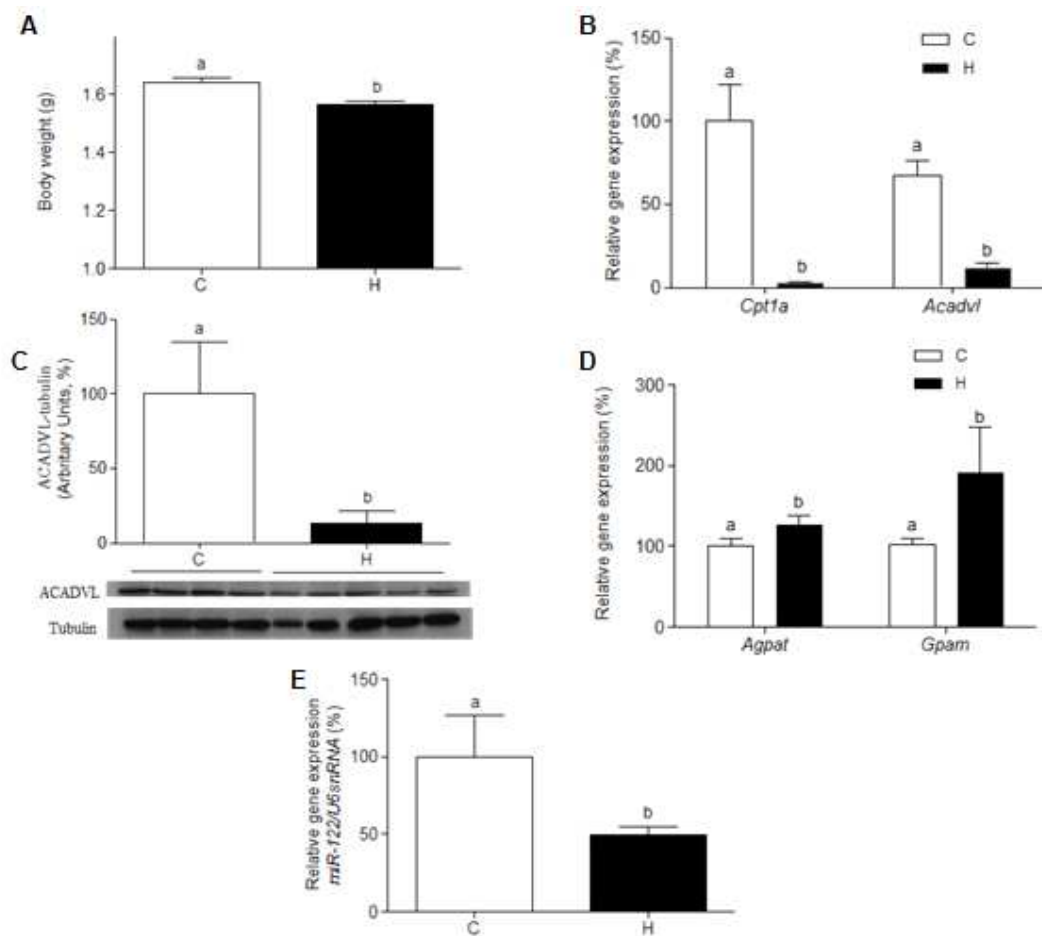
**Table 3.** Lipid profile of offspring at d82, after high-fat diet re-exposure

|                     | d82           |               |               |               |
|---------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|                     | CC            | CC-HF         | HH            | HH-HF         |
|                     | Mean with SEM |               |               |               |
| <b>CHO (mmol/L)</b> | 2.89 ± 0.10 a | 3.20 ± 0.08 a | 3.62 ± 0.12 b | 4.60 ± 0.07 c |
| <b>TAG (mmol/L)</b> | 0.91 ± 0.14 a | 0.77 ± 0.10 a | 0.99 ± 0.25 a | 1.92 ± 0.26 b |

Values are mean ± SEM from 6 pups per group.

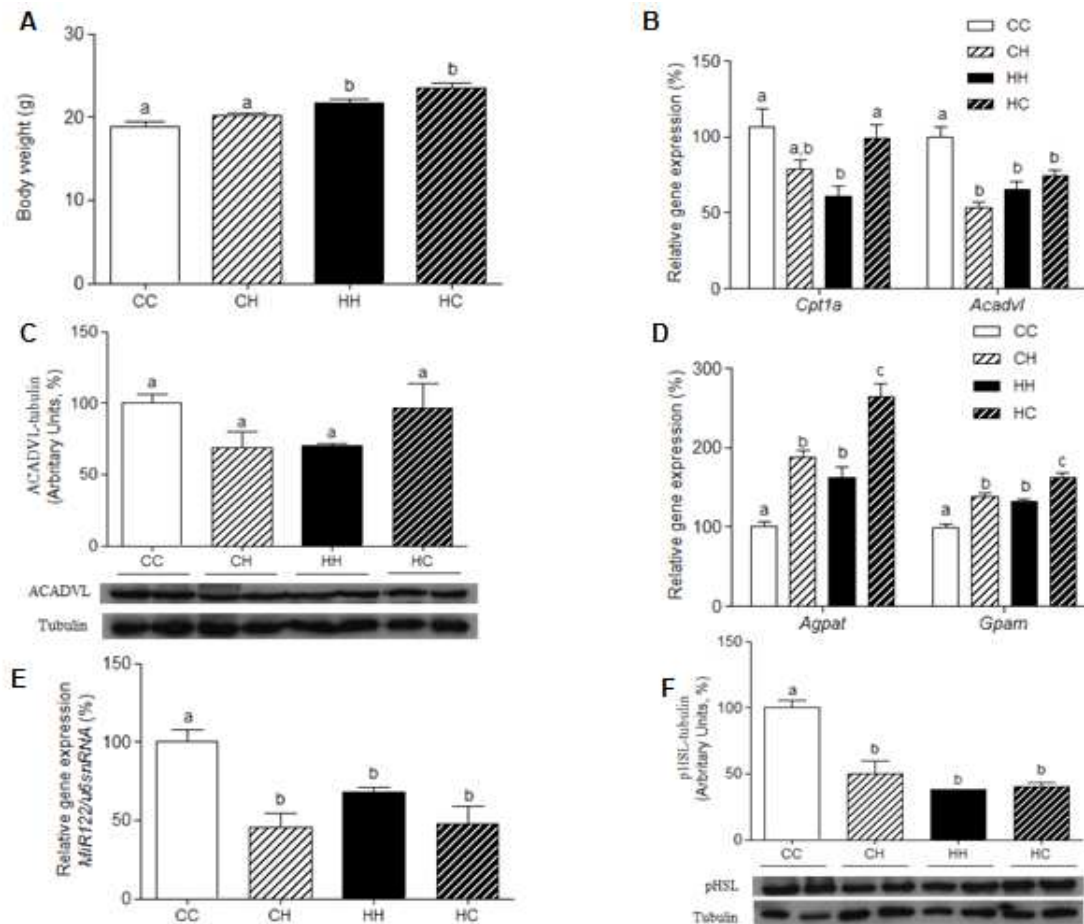
CHO, serum cholesterol; TAG, serum TAG.

Different letters indicate statistical significance between groups of the same experimental day ( $p \leq 0.05$ ).



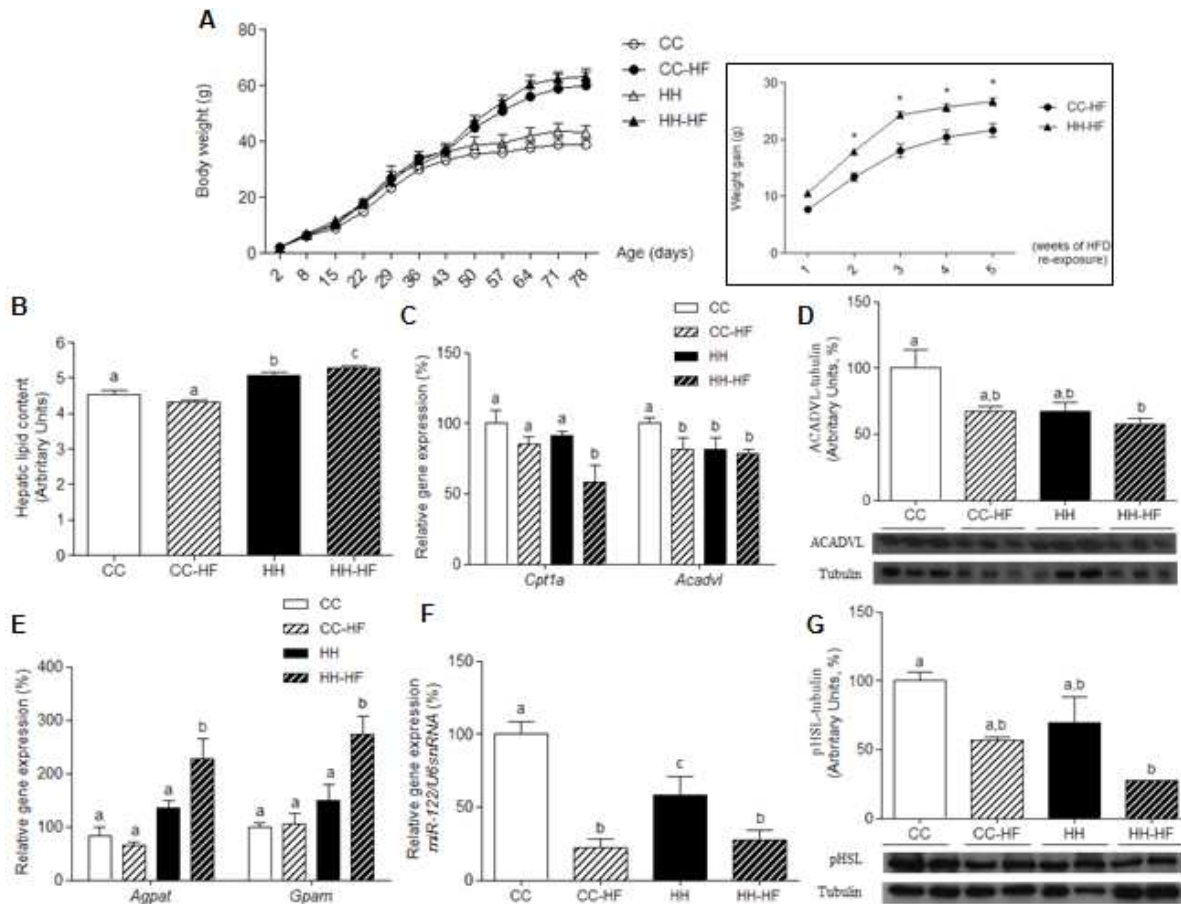
**Fig. 1.** Offspring exposure to maternal obesity throughout gestation induced molecular evidence of decrease in fat oxidation in the liver through epigenetic modulation in newborn mice. Body weight (A), mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic *Cpt1a* and *Acadvl* (B), Western blotting (WB) of hepatic ACADVL (C),

mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic *Agpat* and *Gpm* (D), microRNA level (qRT-PCR) of hepatic *miR-122* (E) in d0 C (offspring of lean dams) and H (offspring of obese dams). For relative gene expression analysis, *Gapdh* and *U6snRNA* were used as endogenous controls. For control of gel loading in WB, membranes were re-blotted with  $\alpha$ -tubulin. Values are means ( $n = 4-8$  for WB and  $n = 5-12$  for qRT-PCR), with their standard errors represented by vertical bars. Different letters indicate statistical significance between groups ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 2.** Offspring exposure to maternal obesity throughout gestation and/or lactation induced altered expression of key hepatic genes involved in fatty acid oxidation and triglyceride synthesis through epigenetic modulation. Body weight (A), mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic *Cpt1a* and *Acadvl* (B), Western blotting (WB) of hepatic ACADVL (C), mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic *Agpat* and *Gpm* (D), microRNA level (qRT-PCR) of hepatic *miR-122* (E), WB of WAT phospho-HSL (Ser565) (F) in d28 CC (offspring of a lean dam suckled by the same dam), CH (offspring of a lean dam suckled by an obese dam), HH (offspring of an obese dam suckled by the same dam) and HC (offspring of an obese dam suckled by a lean dam). For relative gene expression analysis, *Gapdh* and *U6snRNA* were used as the endogenous controls. For control of gel loading in WB, membranes were re-blotted with  $\alpha$ -tubulin. Values

are means ( $n = 4$  for WB and  $n = 5-8$  for qRT-PCR), with their standard errors represented by vertical bars. Different letters indicate statistical significance between groups ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 3.** Re-exposure of offspring of obese dams induced molecular evidence of higher sensitivity to an HFD in adulthood. Body weight (A) and weight gain (insert A), total hepatic lipid content (B), mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic *Cpt1a* and *Acadvl* (C), Western blotting (WB) of hepatic ACADVL (D), mRNA levels (qRT-PCR) of hepatic *Agpat* and *Gpam* (E), microRNA level (qRT-PCR) of hepatic *miR-122* (F), WB of WAT phospho-HSL (Ser565) (G) in d82 CC (offspring of a lean dam), CC-HF (offspring of a lean dam re-exposed to an HFD), HH (offspring of an obese dam) and HH-HF (offspring of an obese dam re-exposed to an HFD). For relative gene expression analysis, *Gapdh* and *U6snRNA* were used as endogenous controls. For control of gel loading in WB, membranes were re-blotted with  $\alpha$ -tubulin. Values are means ( $n = 4$  for WB and hepatic lipid content,  $n = 5-8$  for qRT-PCR), with their standard errors represented by vertical bars. Different letters indicate statistical significance between groups ( $p \leq 0.05$ ).

## DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

A prevalência da obesidade tem aumentado drasticamente em todo o mundo e estudos epidemiológicos mostram que as mulheres fazem parte de um grupo mais vulnerável. Além disso, o excesso de peso durante a gestação acarreta em maiores riscos obstétricos para a mãe, assim como maiores chances do filho desenvolver obesidade e doenças metabólicas (Castro e Avina, 2002; Oken, 2008). Condições adversas em períodos críticos do desenvolvimento, como o período embrionário, resultam em alterações permanentes na estrutura, fisiologia e metabolismo da prole. Esse processo é conhecido como programação metabólica e, tanto o excesso de peso, como o desbalanço na ingestão de nutrientes pela mãe em período gestacional podem desencadear essas alterações (Vickers et al., 2000; Sullivan e Grove, 2010).

A programação metabólica está envolvida com o estabelecimento das respostas fisiológicas e metabólicas ao nascer e ao longo da vida. Estudos epidemiológicos e com animais experimentais demonstram que a saúde e o *status* nutricional da mãe durante a gestação e lactação exercem efeitos centrais e periféricos que regulam o balanço energético na prole em desenvolvimento (Sullivan e Grove, 2010).

Modelos experimentais de supernutrição materna demonstram que a prole exposta à DH durante a gestação e lactação apresenta maior peso corporal e massa de tecido adiposo, ativação de proteínas pró-inflamatórias e marcadores de estresse de retículo endoplasmático no hipotálamo, além de alterações hormonais e no metabolismo lipídico em tecidos periféricos, como tecido adiposo e fígado (Ashino et al., 2012; Mello et al., 2014; Purkayastha et al., 2011; Benatti et al., 2014). Apesar das consequências da programação metabólica para o desenvolvimento metabólico da prole serem bem aceitas, a grande maioria dos estudos não isola os efeitos da

gestação e lactação. Deve-se ainda considerar que a obesidade materna, ou o consumo de DH, durante o período de lactação, promove um aumento na disponibilidade de AGs no leite ofertado ao recém nascido (Priego et al., 2013), o que pode influenciar nos resultados atribuídos ao período gestacional.

Nosso modelo experimental permitiu avaliar os efeitos da obesidade e consumo materno de DH na prole de forma isolada na gestação e lactação. Primeiramente, avaliamos a prole de mães obesas (H) no momento do nascimento (d0). Apesar de alguns autores relatarem aumento de peso corpóreo e macrosomia em filhos nascidos de mães obesas (Okun et al., 1997; Baeten et al., 2001; Kaar et al., 2014; Kang et al., 2014), em nosso trabalho o grupo H apresentou menor peso corpóreo ao nascer em relação a prole de mães eutróficas (C). Esse fato pode estar relacionado a possíveis alterações na placenta das mães obesas, ocasionadas pela hiperglicemia e os altos níveis de insulina circulante dessas mães, que poderiam estar relacionados com alterações no crescimento e função da placenta e, conseqüentemente, com desenvolvimento fetal (Skarzinski et al., 2009; Khamaisi et al., 2012; Kahraman et al., 2014).

Não foram encontradas diferenças nos níveis séricos de CHOL e TAG entre os grupos, porém, interessante, o grupo H apresentou diminuição na expressão gênica de *Cpt1a* e *Acadvl*, genes relacionados com a oxidação de AGs, assim como no conteúdo proteico de ACADVL, no fígado. Além disso, o grupo de mães obesas apresentou expressão aumentada de genes envolvidos na síntese hepática de TAG (*Gpam* e *Agpat*). Concomitante à diminuição na expressão desses genes envolvidos com a  $\beta$ -oxidação e aumento na expressão de genes envolvidos na síntese de TAG, observamos que a prole H exibe menor expressão de *miR-122*.

Os resultados com a prole d0 respondem, em parte, a uma dúvida levantada em um trabalho anterior de nosso grupo, onde observamos que a prole de mães obesas recém desmamada, exposta à DH durante a gestação e lactação, apresentava alterações no metabolismo lipídico hepático, acompanhadas também de diminuição na expressão de *miR-122* (Benatti et al., 2014). Dessa forma, foi possível inferir que as alterações no metabolismo lipídico hepático da prole de mães obesas



poderiam estar relacionada a alterações epigenéticas, como a expressão de miRNAs, porém não era possível afirmar que os efeitos observados eram decorrentes do período gestacional apenas, já que os experimentos foram realizados após o desmame.

Os experimentos com d0 nos deram evidências de que a obesidade materna durante a gestação exerce, de fato, um papel importante para a modulação do metabolismo da prole, fato que já vem sendo demonstrado por outros autores. Gniuli e colaboradores (2008), por exemplo, demonstraram que a exposição intra-uterina à DH prejudica a função das células  $\beta$  pancreáticas na prole, levando ao desenvolvimento de DM2 e à transmissão dessas características para a próxima geração, mesmo na ausência de consumo de DH em outros períodos da vida. Similarmente, Masuyama e Hiramatsu (2012) demonstraram que o consumo materno de DH durante a gestação ocasionava maior ganho de peso e ingestão alimentar, maior pressão arterial e piora na tolerância à glicose, além de alterações no níveis séricos de TAG e leptina da prole.

Porém, alguns estudos atribuem ao período de lactação os efeitos deletérios do consumo materno de DH para a prole. Sun e colaboradores (2012), por exemplo, demonstraram que o consumo materno de DH durante a lactação exerce papel fundamental nas alterações observadas na sinalização da leptina na prole. De forma semelhante, em outro estudo desenvolvido por nosso grupo, foram encontradas alterações hipotalâmicas relacionadas a inflamação e a resposta de proteínas mal-formadas na prole recém-desmamada de mães obesas, porém essas alterações não foram observadas na prole ao nascer, o que sugere que, para esses efeitos, o período de lactação pode ser mais determinante.

No entanto, afim de confirmar os resultados encontrados em d0 e para avaliar se as alterações no metabolismo lipídico hepático logo após o nascimento podem também estar presentes em decorrência da exposição materna à dieta hiperlipídica somente no período de lactação, realizamos experimentos utilizando o modelo de *crossfostering*. Em relação ao peso corpóreo, foi possível observar que ambas as proles geradas por mães obesas (HH e HC), com 28 dias de vida (d28), apresenta maior peso corpóreo em relação às proles CC e CH. Apesar de outros autores terem obtido resultados discrepantes com relação ao peso corpóreo de animais

utilizando modelos de *crossfostering* (Oben et al., 2010; Desai et al., 2014), nossos resultados vão de encontro com o de outros autores que utilizaram métodos similares (Borengasser et al., 2011; Tsuduki et al., 2013; Masuyama e Hiramatsu, 2014), demonstrando que, aparentemente, o ambiente intra-uterino é mais importante, no que diz respeito ao ganho de peso, do que o período de lactação. De forma semelhante, observamos alterações nos parâmetros bioquímicos nos grupos HH e HC, com maiores níveis séricos de CHOL e TAG em comparação aos outros grupos.

Assim como para a prole recém-nascida, observamos na prole recém-desmamada menor expressão gênica de *Cpt1a* em HH e menor expressão gênica de *Acadvl* em todos os grupos expostos à DH de alguma forma (HH, CH e HC) em comparação ao grupo C. Observamos, também, que esses animais (HH, CH e HC) apresentam menor fosforilação da lipase hormônio sensível (p-HSL) no tecido adiposo, sugerindo menor mobilização dessas reservas para utilização como energia. Além de alterações em genes envolvidos na oxidação de AGs, também encontramos, na prole d28, alterações em genes envolvidos na síntese de TAG no fígado. CH, HH e HC apresentaram maior expressão de *Agpat* e *Gpam*, comparados ao grupo controle. Da mesma forma, esses grupos expostos a DH, seja na gestação ou na lactação, têm diminuição na expressão hepática de *miR-122*, demonstrando que as alterações epigenéticas encontradas em d0 podem ser desencadeadas de forma isolada tanto no período intra-uterino como no período de lactação, ou de forma conjunta.

Alguns autores já demonstraram que, além de causar alterações precoces no metabolismo da prole, a programação metabólica desencadeada pela obesidade materna e/ou consumo materno de DH traz consequências que persistem até a vida adulta dos animais, como obesidade, deposição hepática de triglicérides, resistência à ação da insulina, disfunção hepática mitocondrial e aumento da lipogênese (Elahi et al., 2009, Stewart, Heerwagen e Friedman, 2013, Ashino et al., 2012, Samuelsson et al., 2008; Bruce et al., 2009) fatores esses que, em conjunto, podem levar ao desenvolvimento de DHGNA.

Em estudo prévio do nosso grupo, foi demonstrado que a prole de mães obesas, em consumo apenas de dieta padrão, apresenta com 82 dias de vida (d82)

maior peso corporal e maior massa de tecido adiposo epididimal em comparação com a prole de mães magras, além de apresentar maior deposição hepática de TAG (Ashino et al., 2012). No presente estudo, afim de verificar se a prole de mães obesas exibe maior sensibilidade aos efeitos deletérios do consumo de DH em comparação a prole de mães magras, a DH foi reintroduzida a partir de 42 dias de vida até o d82. Observamos que a prole de mães obesas reintroduzida à DH (HH-HF) exibe um ganho de peso maior em relação a prole de mães magras também reintroduzida à DH (CC-HF), já a partir da segunda semana de reexposição. Da mesma forma, o grupo HH-HF apresenta maiores níveis séricos de CHOL e TAG e maior conteúdo total de lipídios hepáticos.

Interessantemente, o grupo HH-HF apresenta alteração no metabolismo lipídico hepático, com diminuição na expressão gênica de *Cpt1a* e *Acadvl*, assim como menor conteúdo proteico de ACADVL e aumento na expressão de *Gpam* e *Agpap*. No tecido adiposo, também observamos menor conteúdo de p-HSL no grupo HH-HF. Essas alterações, em conjunto, fazem parte da patogênese da DHGNA. Alguns autores acreditam que mecanismos epigenéticos decorrentes da exposição *in utero* à DH são responsáveis pelo desenvolvimento da DHGNA na vida adulta. Essa exposição *in utero* é considerada como o "*first hit*", e seria responsável por fazer com que o tecido hepático se tornasse mais vulnerável ao desenvolvimento de esteatose, inflamação e fibrose ao ser exposto a DH (Brumbaugh e Friedman, 2014).

Acreditamos que um desses mecanismos epigenéticos envolvidos no desenvolvimento da patogênese da DHGNA pode ser a modulação da expressão de *miR-122*. Hsu e colaboradores (2012) demonstraram que animais com deleção total ou fígado-específica de *miR-122* apresentam alterações importantes, tais como aumento de deposição hepática de TAG, aumento na expressão de vários genes envolvidos na síntese e deposição de TAG no fígado, além de maiores índices no *score* de inflamação, esteatose e fibrose hepática. Da mesma forma, demonstramos em estudo prévio, como citado anteriormente, que filhos de mães obesas apresentaram desbalanço no metabolismo lipídico, acompanhado de diminuição na expressão de *miR-122* (Benatti et al., 2014) e, no presente estudo, observamos que essa diminuição

persiste até a vida adulta no grupo HH e é ainda mais evidente no grupo reexposto à DH (HH-HF).

Nosso trabalho vai ao encontro com resultados prévios de outros autores que demonstram que o consumo de DH durante os períodos de gestação e lactação pode levar a uma maior sensibilidade da prole quando submetida a um segundo insulto com essa dieta. Glavas e colaboradores (2010) demonstraram que a supernutrição *in utero* desencadeia na prole um maior ganho de peso, resistência à ação da insulina e hepatoesteatose, quando expostos à DH na vida adulta. Mais recentemente, foi demonstrado ainda que a prole de mães obesas, quando submetida a DH na vida adulta, apresenta disfunções mitocondriais e alterações importantes nos adipócitos (Kruse et al., 2013).

Em resumo, nossos resultados sugerem que o consumo materno de DH durante ambos os períodos de gestação e lactação podem afetar o fenótipo metabólico da prole. No entanto, o período gestacional parece promover alterações mais acentuadas em relação ao período de lactação. A prole de mães obesas exibe maior sensibilidade aos efeitos deletérios da exposição à DH na vida adulta. Além disso, a expressão de *miR-122* no fígado parece estar diretamente relacionada às alterações no metabolismo lipídico hepático, sendo que os ácidos graxos presentes na DH, na circulação e no leite materno podem ser responsáveis pela diminuição na sua expressão. No entanto, são necessários estudos adicionais a fim de avaliar como a intervenção nutricional durante os períodos de gestação e lactação poderiam contribuir para a melhora no metabolismo lipídico da prole.

## REFERÊNCIAS

- Alfaradhi MZ, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Musial B, Fowden A, Ozanne SE. Oxidative stress and altered lipid homeostasis in the programming of offspring fatty liver by maternal obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2014 Jul 1;307(1):R26-34.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003; 9(3):277-9.
- Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potencial. *Cell* 2001; 107(7):823-6.
- Andresen BS, Bross P, Vianey-Saban C, Divry P, Zabot MT, Roe CR, Nada MA, Byskov A, Kruse TA, Neve S, Kristiansen K, Knudsen I, Corydon MJ, Gregersen N. Cloning and characterization of human very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase cDNA, chromosomal assignment of the gene and identification in four patients of nine different mutations within the VLCAD gene. *Hum Mol Genet*. 1996 Apr;5(4):461-72. Erratum in: *Hum Mol Genet* 1996 Sep;5(9):1390.
- Ashino NG, Saito KN, Souza FD, Nakutz FS, Roman EA, Velloso LA, Torsoni AS, Torsoni MA. Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *J Nutr Biochem*. 2012 Apr;23(4):341-8.
- Baeten JM, Bukusi EA, Lambe M. Pregnancy complications and outcomes among overweight and obese nulliparous women. *Am J Public Health*. 2001 Mar;91(3):436-40.
- Belahasen R. Nutrition transition and food sustainability. *Proceedings of the Nutrition Society* 2014, 73, 385–388.
- Benatti RO, Melo AM, Borges FO, Ignacio-Souza LM, Simino LA, Milanski M, Velloso LA, TorsoniMA, Torsoni AS. Maternal high-fat diet consumption modulates hepatic lipid metabolism and microRNA-122 (miR-122) and microRNA-370 (miR-370) expression in offspring. *Br J Nutr*. 2014 Jun 28;111(12):2112-22.
- Bentwich I, Anviel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; 37(7):766-70.

- Bonnefont JP, Djouadi F, Prip-Buus C, Gobin S, Munnich A, Bastin J. Carnitine palmitoyltransferases 1 and 2: biochemical, molecular and medical aspects. *Mol Aspects Med.* 2004 Oct-Dec;25(5-6):495-520.
- Borengasser SJ, Lau F, Kang P, Blackburn ML, Ronis MJ, Badger TM, Shankar K. Maternal obesity during gestation impairs fatty acid oxidation and mitochondrial SIRT3 expression in rat offspring at weaning. *PLoS One.* 2011;6(8):e24068.
- 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 Dec;50(6):1796-808.
- Brumbaugh DE, Friedman JE. Developmental origins of nonalcoholic fatty liver disease. *Pediatr Res.* 2014 Jan;75(1-2):140-7.
- Castro LC, Avina RL. 2002. Maternal obesity and pregnancy outcomes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 14:601-6.
- Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432:231–235.
- Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol.* 2014 Sep;211(3):237.e1-237.e13.
- Elmén J, Lindow M, Schütz S, Lawrence M, Petri A, Obad S, Lindholm M, Hedtjörn M, Hansen HF, Berger U et al. LNA-mediated microRNA silencing in nonhuman primates. *Nature* 2008, 452, 896–899.
- Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, Watts L, Booten SL, Graham M, McKay R, Subramaniam A, Propp S, Lollo BA, Freier S, Bennett CF, Bhanot S, Monia BP. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metab.* 2006 Feb;3(2):87-98.
- Ferland-McCollough D, Ozanne SE, Siddle K, Willis AE, Bushell M. 2010. The involvement of microRNAs in Type 2 diabetes. *Biochem Soc Trans* 38(6):1565-70.
- Foulle F, Girard J, Ferré P. Regulation of lipogenic enzyme expression by glucose in liver and adipose tissue: a review of the potential cellular and molecular mechanisms. *Adv Enzyme Regul.* 1996;36:199-226.
- Girard M, Jacquemin E, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A. miR-122, a paradigm for the role of microRNAs in the liver. *J Hepatol.* 2008 Apr;48(4):648-56.

- Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, Enriori PJ, Fisher SK, Evans AE et al., Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology*. 2010 Apr;151(4):1598-610.
- Gniuli D, Calcagno A, Caristo ME, Mancuso A, Macchi V, Mingrone G, Vettor R. Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. *J Lipid Res*. 2008 Sep;49(9):1936-45.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*. 2000;404:293–296.
- Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR, Mao H, Wei M, Clark KR, Mendell JR, Caligiuri MA, Jacob ST, Mendell JT, Ghoshal K. Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *J Clin Invest*. 2012 Aug 1;122(8):2871-83.
- Iliopoulos D, Drosatos K, Hiyama Y, Goldberg IJ, Zannis VI. MicroRNA-370 controls the expression of microRNA-122 and Cpt1a $\alpha$  and affects lipid metabolism. *J Lipid Res*. 2010 Jun;51(6):1513-23.
- Kaar JL, Crume T, Brinton JT, Bischoff KJ, McDuffie R, Dabelea D. Maternal obesity, gestational weight gain, and offspring adiposity: the exploring perinatal outcomes among children study. *J Pediatr*. 2014 Sep;165(3):509-15.
- Kahraman S, Dirice E, De Jesus DF, Hu J, Kulkarni RN. Maternal insulin resistance and transient hyperglycemia impact the metabolic and endocrine phenotypes of offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2014 Nov 15;307(10):E906-18.
- Kaur J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol Res Pract*. 2014;2014:943162.
- King JC. 2006. Maternal obesity, metabolism, and pregnancy outcomes. *Annu Rev Nutr* 26:271-91.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000 6;404(6778):635–43.
- Kruse M, Seki Y, Vuguin PM, Du XQ, Fiallo A, Glenn AS et al., High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. *Endocrinology*. 2013 Oct;154(10):3565-76.
- Lavie CJ, De Schutter A, Milani RV. Healthy obese versus unhealthy lean: the obesity paradox. *Nat Rev Endocrinol*, 2014. Epub ahead of print.

- Li YY. Genetic and epigenetic variants influencing the development of nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol* 2012; 18(45): 6546-6551.
- Masuyama H, Hiramatsu Y. Effects of a high-fat diet exposure in utero on the metabolic syndrome-like phenomenon in mouse offspring through epigenetic changes in adipocytokine gene expression. *Endocrinology*. 2012. 153(6):2823-30.
- Melo AM, Benatti RO, Ignacio-Souza LM, Okino C, Torsoni AS, Milanski M, Velloso LA, TorsoniMA. Hypothalamic endoplasmic reticulum stress and insulin resistance in offspring of mice dams fed high-fat diet during pregnancy and lactation. *Metabolism*. 2014 May;63(5):682-92.
- Nakao K, Miyaaki H, Ichikawa T. Antitumor function of microRNA-122 against hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2014 Apr;49(4):589-93.
- Nicholas LM, Rattanatrak L, Morrison JL, Kleemann DO, Walker SK, Zhang S, MacLaughlin S, McMillen IC. Maternal obesity or weight loss around conception impacts hepatic fatty acid metabolism in the offspring. *Obesity (Silver Spring)*. 2014 Jul;22(7):1685-93.
- Oben JA, Mouralidarane A, Samuelsson AM, Matthews PJ, Morgan ML, McKee C, Soeda J, Fernandez-Twinn DS, Martin-Gronert MS, Ozanne SE, Sigala B, Novelli M, Poston L, Taylor PD. Maternal obesity during pregnancy and lactation programs the development of offspring non-alcoholic fatty liver disease in mice. *J Hepatol*. 2010 Jun;52(6):913-20.
- Ogunbode AM, Ladipo MMA, Ajayi IO, Fatiregun AA. Obesity: An emerging disease. 2011. *Niger J Clin Pract*. 2011 Oct-Dec;14(4):390-4.
- Ojha S, Robinson L, Symonds ME, Budge H. Suboptimal maternal nutrition affects offspring health in adult life. *Early Human Development* 89 (2013) 909–913.
- Oken E, Rifas-Shiman SL, Field AE, Frazier AL, Gillman MW. Maternal gestational weight gain and offspring weight in adolescence. *Obstet Gynecol* 2008;112:999-1006.
- Okun N, Verma A, Mitchell BF, Flowerdew G. Relative importance of maternal constitutional factors and glucose intolerance of pregnancy in the development of newborn macrosomia. *J Matern Fetal Med*. 1997 Sep-Oct;6(5):285-90.
- Popkin BM. The Nutrition Transition and Obesity in the Developing World. *J. Nutr*. 2001. 131: 871S–873S.

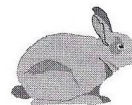


- Power ML, Schulkin J. Maternal obesity, metabolic disease, and allostatic load. *Physiol Behav.* 2012 Apr 12;106(1):22-8.
- Priego T, Sa´nchez J, Garcı´a AP, et al. (2013) Maternal dietary fat affects milk fatty acid profile and impacts on weight gain and thermogenic capacity of suckling rats. *Lipids* 48, 481–495.
- Purkayastha S, Zhang H, Zhang G, Ahmed Z, Wang Y, Cai D. Neural dysregulation of peripheral insulin action and blood pressure by brain endoplasmic reticulum stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011; 108 2939–2944.
- Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med.* 1976 Aug 12;295(7):349-53.
- Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EH et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. *Hypertension.* 2008 Feb; 51(2): 383-92.
- Segovia SA, Vickers MH, Gray C, Reynolds CM. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. *Biomed Res Int.* 2014;2014:418975.
- Shankar K, Harrell A, Liu X, Gilchrist JM, Ronis MJ, et al. (2008) Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R528–R538.
- Sofi F, Casini A. Mediterranean diet and non-alcoholic fatty liver disease: new therapeutic option around the corner? *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21;20(23):7339-46.
- Stein CJ, Colditz GA. The epidemic of obesity. 2004. *J Clin Endocrinol Metab.* Jun;89(6):2522-5.
- Stewart MS, Heerwagen MJ, Friedman JE. Developmental programming of pediatric nonalcoholic fatty liver disease: redefining the "first hit". *Clin Obstet Gynecol.* 2013 Sep;56(3):577-90.
- Sullivan EL and Grove KL. Metabolic Imprinting of Obesity. *Forum Nutr.* 2010 ; 63: 186–194.
- Tardido AP, Falcão MC. O impacto da modernização na transição nutricional e obesidade. *Rev Bras Nutr Clin* 2006; 21(2):117-24.
- Thamilarasan M, Koczan D, Hecker M, Paap B, Zettl UK. MicroRNAs in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Autoimmun Rev.* 2012 Jan;11(3):174-9.

- Thorn SR, Baquero KC, Newsom SA, El Kasmi KC, Bergman BC, Shulman GI, Grove KL, Friedman JE. Early life exposure to maternal insulin resistance has persistent effects on hepatic NAFLD in juvenile nonhuman primates. *Diabetes*. 2014 Aug;63(8):2702-13.
- Tsai WC, Hsu SD, Hsu CS, Lai TC, Chen SJ, Shen R, Huang Y, Chen HC, Lee CH, Tsai TF, Hsu MT, Wu JC, Huang HD, Shiao MS, Hsiao M, Tsou AP. MicroRNA-122 plays a critical role in liver homeostasis and hepatocarcinogenesis. *J Clin Invest*. 2012 Aug 1;122(8):2884-97.
- Tsuduki T, Kitano Y, Honma T, Kijima R, Ikeda I. High dietary fat intake during lactation promotes development of diet-induced obesity in male offspring of mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2013;59(5):384-92.
- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, Hofman PL, Gluckman PD. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2000 Jul;279(1):E83-7.
- Wahlig JL, Bales ES, Jackman MR, Johnson GC, McManaman JL, Maclean PS. Impact of high-fat diet and obesity on energy balance and fuel utilization during the metabolic challenge of lactation. *Obesity (Silver Spring)*. 2012 Jan;20(1):65-75.
- Wen J, Friedman JR. miR-122 regulates hepatic lipid metabolism and tumor suppression. *J Clin Invest*. 2012 Aug 1;122(8):2773-6.
- Won JC, Jang PG, Namkoong C, Koh EH, Kim SK, Park JY, Lee KU & Kim MS. Central administration of an endoplasmic reticulum stress inducer inhibits the anorexigenic effects of leptin and insulin. *Obesity (Silver Spring)* 17 1861-1865.
- World Health Organization, 2013. World Health Statistics. Disponível em [www.who.int](http://www.who.int). Acesso em 15/08/2014.
- Yang YM, Seo SY, Kim TH, Kim SG. Decrease of microRNA-122 causes hepatic insulin resistance by inducing protein tyrosine phosphatase 1B, which is reversed by licorice flavonoid. *Hepatology*. 2012 Dec;56(6):2209-20.
- Zambrano E, Nathanielsz PW. Mechanisms by which maternal obesity programs offspring for obesity: evidence from animal studies. *Nutr Rev*. 2013, Suppl 1:S42-54.

## ANEXOS

### Anexo 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Animal



CEUA/Unicamp

#### Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Obesidade materna e os efeitos no metabolismo de lipídeos e na expressão de miR122 observados na prole ao nascer e na exposição à dieta hiperlipídica na vida adulta" (protocolo nº 3175-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Adriana Souza Torsoni / Laís Angélica de Paula Simino, 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 27 de novembro de 2013.

Campinas, 13 de outubro de 2014.

2ª. VIA

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira  
Presidente

Fátima Alonso  
Secretária Executiva