



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

VANESSA BARBOSA VERONESI

**A INFLUÊNCIA DE AGONISTAS DE PPAR γ OU PPAR α NA
PROGRAMAÇÃO METABÓLICA DECORRENTE DE RESTRIÇÃO
CALÓRICA DURANTE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

CAMPINAS

2020

VANESSA BARBOSA VERONESI

**A INFLUÊNCIA DE AGONISTAS DE PPAR γ OU PPAR α NA
PROGRAMAÇÃO METABÓLICA DECORRENTE DE RESTRIÇÃO
CALÓRICA DURANTE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ

COORIENTADORA: PROF^a. DR^a. SILVANA AUXILIADORA BORDIN DA SILVA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA VANESSA BARBOSA VERONESI, E ORIENTADA PELO PROF.
DR. GABRIEL FORATO ANHÊ E COORIENTADA PELA PROF^a DR^a SILVANA
AUXILIADORA BORDIN DA SILVA

CAMPINAS

2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V599i Veronesi, Vanessa Barbosa, 1991-
A influência de agonistas PPAR_{gamma} ou PPAR_{alpha} na programação metabólica decorrente de restrição calórica durante a gestação e a lactação / Vanessa Barbosa Veronesi. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Gabriel Forato Anhô.

Coorientador: Silvana Auxiliadora Bordin.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Restrição calórica. 2. Feto - Desenvolvimento. 3. Metabolismo. I. Anhô, Gabriel Forato, 1980-. II. Bordin, Silvana. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The influence of PPAR_{gamma} or PPAR_{alpha} agonists on metabolic programming due to caloric restriction during pregnancy and lactation

Palavras-chave em inglês:

Caloric restriction

Fetus, Development

Metabolism

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

Gabriel Forato Anhô [Orientador]

José Donato Júnior

Maria Isabel Cardoso Alonso Vale

Marciane Milanski Ferreira

Sandra Yasuyo Fukada Alves

Data de defesa: 14-08-2020

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5873-9287>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9265621516626041>

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

VANESSA BARBOSA VERONESI

ORIENTADOR: PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHÊ

2. PROF^a. DR^a. MARCIANE MILANSKI FERREIRA

3. PROF^a. DR^a. SANDRA YASUYO FUKADA ALVES

4. PROF^a. DR^a. MARIA ISABEL CARDOSO ALONSO VALE

5. PROF. DR. JOSÉ DONATO JÚNIOR

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 14/08/2020

Dedico este trabalho aos meus avôs, Dinho e Toninho e a minha avó Olga que não se encontram mais junto de nós. Sei que ficariam imensamente felizes de ver o caminho que trilhei e a profissional que me tornei!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora que sempre me conduziram para os melhores caminhos, me sustentando, guiando e me mostrando que tudo tem um tempo predeterminado para acontecer e que os “porquês” e “para quês” só serão compreendidos a partir de uma fé que não se explica, apenas se crê e sente!

Ao meu esposo, Rodrigo, que é meu companheiro, meu sorriso diário, minha calma nos momentos de desespero, meu alicerce para que eu pudesse crescer firme no propósito sem desanimar diante das perdas e dos momentos difíceis que passei ao longo desses quatro anos. Amor, obrigada por tudo! Minha caminhada até aqui foi mais leve pois sempre tive seu apoio e compreensão.

Aos meus pais, Geraldo Sérgio e Rita, que sempre me apoiaram, rezaram e se empenharam para que eu pudesse construir um futuro digno baseado em caráter, educação e fé. Pai e mãe, como já lhes disse, tudo que sou hoje devo a vocês. Nada disso seria possível se não tivesse o amor, o carinho e os conselhos que vocês sempre me deram. Meu amor e minha gratidão serão eternas, pois eu sei quantas renúncias fizeram para que eu conquistasse os meus sonhos. Amo vocês!

A minha irmã, Danielle, que sempre foi minha inspiração de mulher e profissional farmacêutica. Obrigada por todo apoio, amor, por acreditar em mim e por inúmeras vezes ouvir meus lamentos. Por sempre ter tempo para me aconselhar e me confortar. A você, minha irmã querida, obrigada por ser tanto na minha vida. Te amo!

Aos meus sobrinhos, Beatriz e Matheus, por me mostrarem da forma mais simples que a vida é cheia de momentos incríveis e que a melhor forma de vivê-la é estando ao lado de quem a gente ama. Obrigada meus pequenos, por serem fundamentais na minha busca diária de ser uma pessoa melhor.

Aos meus cunhados Harrison, Rafael e Ana Luiza, aos meus sogros, Marcos e Zélia, e a todos os meus familiares. Gratidão por todo carinho, torcida e orações. Amo vocês!

Ao meu orientador, professor Dr. Gabriel Forato Anhê, pela oportunidade de estar em seu laboratório e compor uma equipe de pós-graduandos tão dedicados. Pela convivência, paciência e as inúmeras conversas científicas. Por todo tempo dispensado contribuindo para minha formação. A você, Gabriel, minha gratidão eterna por sempre acreditar em mim e no nosso trabalho. Sempre levarei seus ensinamentos comigo!

Aos amigos do laboratório e de departamento, Mariana Pioli, Fernanda Hecht, Julia Modesto, Carolina Campos, Amanda Cavalcante, Caio Jordão, Dailson Nogueira, Rodrigo Lacerda, Rafael Maróstica, Filipe Mesquita, Junia Rebelo, Lorena Almeida, Chelsy Ifekaibeya, Sandra Bonilla, aos amigos do antigo laboratório Farmaco CV e as amadas amigas da “TROPA”. Obrigada por todos os dias trazerem o sorriso aos meus lábios e a alegria no meu coração. A convivência com vocês fez a trajetória ser mais gostosa e menos exaustiva.

Aos bioteristas, Sr. Miguel, Ivani, Aguinaldo e Marco, por todo cuidado aos animais de laboratório.

Ao secretário, Gustavo Teramatsu, que sempre com muito zelo, competência e paciência, nunca mediu esforços para me ajudar.

Aos professores das bancas de qualificação e defesa que aceitaram o convite e tanto colaboraram para a finalização desta tese.

Aos animais de experimentação, pois sem eles nosso trabalho e tantas outras pesquisas não seriam passíveis de realização.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro essencial para construção dessa Tese de Doutorado através do Processo 2016/13138-9.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Enfim, a todos que contribuíram para eu chegar até aqui, obrigada! Serei imensamente grata por todas as pessoas e as oportunidades que surgiram nestes 4 anos de caminhada.

“...Cada um de nós compõe a sua história

Cada ser em si

Carrega o dom de ser capaz

E ser feliz...”

Tocando em frente - Almir Sater e Renato Teixeira, 1990

RESUMO

Ratos nascidos de mães submetidas à restrição calórica (RC) durante a gravidez e lactação exibem menor peso ao nascer e menor adiposidade na vida adulta. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPARs) são receptores nucleares que desempenham papéis importantes na diferenciação de adipócitos e controle de adiposidade. O objetivo desta tese foi avaliar se o uso de agonistas PPAR α (gemfibrozila) ou PPAR γ (pioglitazona) em mães expostas à RC durante a gestação e lactação seriam capazes de programar na prole uma recuperação do peso ao longo da vida sem alterações metabolicamente desfavoráveis. Para isso, ratas Wistar foram mantidas em RC de 50% desde o 11º dia de gestação até o 21º dia de lactação, período no qual as drogas gemfibrozila (90mg/kg) ou pioglitazona (10mg/kg) foram incorporadas à ração padrão. Após o desmame, as proles fêmeas seguiram com dieta padrão entre as 22ª e 27ª semanas de vida, sendo submetidas a múltiplas análises ao longo deste período (dosagem de lipídeos, calorimetria indireta, ensaio de produção de VLDL, DEXA para composição corporal, pesagem de coxins adiposo e análise de expressão gênica em tecidos adiposos brancos e marrom). Observamos que o tratamento de mães expostas à RC com gemfibrozila gerou uma prole que teve a capacidade de consumir mais alimento e ganhar mais peso ao longo da vida, resultando em maior adiposidade na vida adulta. Este ganho de adiposidade foi acompanhado de menor acúmulo de gordura no fígado e menor produção de VLDL na vida adulta. Além disto, tal ganho não foi acompanhado de redução no gasto energético, resistência à insulina ou intolerância à glicose. As mães tratadas com gemfibrozila apresentaram concentrações de corticosterona menores que as mães RC no 15º dia de gestação. Já a ativação materna do PPAR γ durante a gestação e lactação associadas à RC, por sua vez, não afetou o peso corporal das filhas, mas aumentou a adiposidade visceral. Ao contrário da ativação materna de PPAR α , os animais nascidos de mães tratadas com pioglitazona apresentaram inflexibilidade metabólica e redução do gasto energético na vida adulta. Estes efeitos foram acompanhados por redução da expressão gênica de UCP1 no tecido adiposo marrom (BAT), bem como menor peso relativo deste coxim. Além disso, também houve aumento da expressão de genes relacionados a captação e reesterificação de ácidos graxos no tecido adiposo branco da prole nascida de mães expostas à RC e tratadas com pioglitazona.

ABSTRACT

Rats born from mothers submitted to caloric restriction (CR) during pregnancy and lactation exhibit lower birth weight and lower adiposity in adulthood. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) are nuclear receptors that play important roles in adipocyte differentiation and adiposity control. The objective of this thesis was to evaluate whether the use of PPAR α (gemfibrozil) or PPAR γ (pioglitazone) agonists in mothers exposed to CR during pregnancy and lactation would be able to program in their offspring a lifelong weight recovery without metabolically unfavorable changes. For this, Wistar rats were maintained at a 50% CR from the 11th day of gestation until the 21st day of lactation, during which the drugs gemfibrozil (90mg/kg) or pioglitazone (10mg/kg) were incorporated into the standard diet. After weaning, the female offspring followed a standard diet between the 22nd and 25th weeks of life, being subjected to multiple analyzes throughout this period (lipid measurement, indirect calorimetry, VLDL production assay, DEXA for body composition, weighing of fat pads and analysis of gene expression in white and brown adipose tissues). We observed that the treatment of mothers exposed to CR with gemfibrozil generated an offspring that had the ability to consume more food and gain more weight throughout life, resulting in greater adiposity in adulthood. This gain in adiposity was accompanied by less accumulation of fat in the liver and less production of VLDL in adulthood. In addition, this gain was not accompanied by a reduction in energy expenditure, insulin resistance or glucose intolerance. Mothers treated with gemfibrozil had lower corticosterone concentrations than CR mothers on the 15th day of pregnancy. The maternal activation of PPAR γ during pregnancy and lactation associated to CR, although, did not affect the female pups body weight, but increased visceral adiposity. Unlike maternal PPAR α activation, animals born from mothers treated with pioglitazone showed metabolic inflexibility and reduced energy expenditure in adulthood. These effects were accompanied by a reduction in UCP1 gene expression in brown adipose tissue (BAT), as well as a lower relative weight of this pad. In addition, there was also an increase in the expression of genes related to the uptake and reesterification of fatty acids in the white adipose tissue of offspring born from mothers exposed to CR and treated with pioglitazone.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Diagrama do <i>Thrifty Phenotype</i>	24
Figura 2 -	Mecanismo de ativação do PPAR.....	27
Figura 3 -	Funções das 3 isoformas dos PPARs nos diferentes tecidos.....	28
Figura 4 -	Genes alvo do PPAR α no fígado humano.....	29
Figura 5 -	Estrutura química do fármaco GEM.....	30
Figura 6 -	Estrutura da Pioglitazona.....	33
Figura 7-	Massa corporal (g) das mães CTL (n= 5), RC (n= 4-5) e RC+GEM (n= 6) no 11° DG, 1° DL, 8° DL, 15° DL e 21° DL.....	44
Figura 8 -	Concentrações de TG e Colesterol em ratas gestantes no 15° (A, B) e no 20° (C, D) DG.....	45
Figura 9 -	Quantidade de TG em fígado de ratas gestantes no 15° (A) e no 20° (B) DG.....	46
Figura 10 -	Concentrações de corticosterona em de ratas prenhas no 15°(A) e no 20° DG (B).....	47
Figura 11 -	Massa corporal das proles nascidas de mães CTL (n= 7-15), RC (n= 8-15) e RC+GEM (n= 5-11) na 7ª, 12ª, 16ª, 20ª e 24ª semanas de vida.....	48
Figura 12 -	Ingestão alimentar na 7ª (A), 12ª (B), 16ª (C), 20ª (D) e 24ª (E) semanas de vida de ratas nascidas de mães CTL (n=11), RC (n=6) e RC+GEM (n=5).....	49
Figura 13 -	Concentrações de TG (A) e colesterol (B) no soro dos neonatos nascidos de mães CTL (n=12), RC (n=9) e RC+GEM (n=6) no dia 1 de lactação.....	51
Figura 14 -	Concentração de TG no soro de ratas em jejum nascidas de mães CTL (n= 7), RC (n= 5) e RC+GEM (n= 4) com 24 semanas de vida (a). Concentração de tg (b) e colesterol (c) no soro de ratas em estado alimentado nascidas de mães CTL (n= 15), RC (n= 12) e RC+GEM (n= 12-13) com 27 semanas de vida.....	52
Figura 15 -	Quantidade de TG no fígado de ratas nascidas de mães CTL (n=6), RC (n=6) e RC+GEM (n=9) com 26 semanas de vida.....	53

Figura 16 -	Concentrações de TG após aplicação de Tyloxapol na 12° (A) e na 24° (B) semanas de vida de fêmeas nascidas de mães CTL (n= 6-7), RC (n= 4-6) e RC+GEM (n= 4-6).....	54
Figura 17 -	Gasto energético e quociente respiratório em ratas nascidas de mães CTL (n= 8), RC (n= 9) e RC+GEM (n= 5) entre a 22° e 26° semanas de vida.....	55
Figura 18 -	Tolerância à glicose nas ratas nascidas de mães CTL (n= 12), RC (n= 11) e RC+GEM (n= 8) 24° semana de vida.	56
Figura 19 -	Sensibilidade à insulina nas ratas nascidas de mães CTL (n= 14), RC (n= 10) e RC+GEM (n=7) na 25° semana de vida.	57
Figura 20 -	Peso relativo da gorduras perigonadal (A) , retroperitoneal (B) e do BAT (C) das filhas de mães CTL (n= 7), RC (n= 8) e RC+GEM (n= 5) na 27° semana de vida.....	59
Figura 21 -	Massa corporal (g) das mães CTL (n= 15), RC (n= 15), PIO (n= 11) e RC+PIO (n= 18) no 11° DG, 1° DL, 10° DL e 21° DL.....	61
Figura 22 -	Massa das proles nascidas de mães CTL (n= 8-15), RC (n= 8-15), PIO (n= 5-11) e RC+PIO (n= 8-18) na 7ª, 12ª, 16ª, 20ª e 24ª semanas de vida..	63
Figura 23 -	Ingestão alimentar de ratas nascidas de mães CTL (n= 11), RC (n= 6), PIO (n= 10-12) e RC+PIO (n= 8) na 7ª (A) , 12ª (B) , 16ª (C) , 20ª (D) e 24ª (E) semanas de vida.....	65
Figura 24 -	Gasto energético e quociente respiratório em termoneutralidade da 22ª a 26ª semanas de vida das ratas nascidas de mães CTL (n= 5), RC (n= 5), PIO (n= 3) e RC+PIO (n= 7).....	66
Figura 25 -	Concentrações de TG (A) e colesterol (B) no soro dos neonatos de ratas CTL (n= 4), RC (n= 4), PIO (n= 3) e RC+PIO (n= 5) no dia 1 de lactação.	67
Figura 26 -	Concentração de TG (A) e colesterol (B) no soro das fêmeas nascidas de mães CTL, RC, PIO e RC+PIO com 27 semanas de vida e em estado alimentado (CTL n= 15, RC n= 13, PIO n= 12 e RC+PIO n= 10).....	68
Figura 27-	Quantidade de TG no fígado de ratas nascidas de mães CTL (n=7), RC (n=8), PIO (n=4) e RC+PIO (n=8) com 27ª semana de vida.....	69
Figura 28 -	Teste de tolerância à glicose na 24ª semana de vida das ratas advindas de mães CTL (n= 12), RC (n=11), PIO (n=11) e RC+PIO (n=7).....	70

Figura 29 -	Sensibilidade à insulina nas ratas nascidas de mães CTL (n= 14), RC (n= 10), PIO (n= 10) e RC+PIO(n=7) na 25ª semana de vida.....	71
Figura 30 -	Porcentagem do peso relativo dos coxins perigonadal (A) e retroperitoneal (B) e do BAT (C) de filhas nascidas de mães CTL (n= 7), RC (n= 8), PIO (n= 5) e RC+PIO (n= 8).....	73
Figura 31 -	Expressão de diferentes genes, PPAR γ (A) , FASN (B) , LPL (C) , CD36 (D) , DGAT1 (E) , UCP1 (F) , CPT1 (G) , DGAT 2 (H) , PGC1 α (I) , no coxim perigonadal de filhas nascidas de mães CTL (n= 5-6), RC (n= 6-7), PIO (n= 4-5) e RC+PIO (n= 6).....	74
Figura 32 -	Expressão de diferentes genes, PGC 1 α (A) , UCP 1 (B) , FASN (C) , PPAR γ (D) , DGAT1 (E) , CD36 (F) , LPL (G) , DGAT 2 (H) , CPT1 (I) , no coxim retroperitoneal de ratas nascidas de mães CTL (n= 6-7), RC (n= 6-7), PIO (n= 4-5) e RC+PIO (n= 6-7).....	76
Figura 33 -	Expressão de diferentes genes UCP1 (A) , CideA (B) , CideC (C) , XdH (D) , PPAR γ (E) no BAT de ratas nascidas de mães CTL (n= 6), RC (n= 8), PIO (n= 5) e RC+PIO (n= 7-8).....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sequência de primers de ratos utilizados para análise da expressão gênica dos coxins adiposos perigonadal, retroperitoneal e BAT.....	41
Tabela 2 -	Análise de adiposidade por tomografia computadorizada das fêmeas nascidas de mães CTL (n= 5), RC (n= 5) e RC+GEM (n= 4) entre a 20° e 22° semana de vida.....	50

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

µg	- Micrograma
µL	- Microlitro
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apo CIII	- Apolipoproteína CIII
BAT	- Tecido Adiposo Marrom
BPN	- Baixo Peso ao Nascer
CD36	- Codificação de proteínas 36
cDNA	- Ácido Desoxirribonucleico complementar
CEMIB	- Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	- Comissão de ética no uso animal
CO₂	- Dióxido de carbono
CPT1	- Carnitina Palmitoiltransferase 1A
CTL	- Controle
DG	- Dia de Gestação
DGAT1	- Diacilglicerol O-aciltransferase 1
DGAT2	- Diacilglicerol O-aciltransferase 2
DL	- Dia de lactação
DM2	- Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
EE	- Gasto energético
FASN	- Ácido graxo sintase
FDA	- <i>Food and Drug Administration</i>
Fig.	- Figura
g	- Gramas
GEM	- Gemfibrozila
GTT	- Teste de tolerância à glicose
h	- Hora
HDL	- Lipoproteína de alta densidade (<i>High Density Lipoprotein</i>)
IDF	- <i>Internacional Diabetes Federation</i>
IGF-1	- Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1 (<i>Insulin like growth fator 1</i>)
IMC	- Índice de Massa Corporal

ITT	- Teste de Tolerância a Insulina
IUGR	- <i>Intrauterine growth restriction</i>
Kg	- Quilograma
kITT	- Constante de decaimento de glicose após sobrecarga com insulina
LDL	- Lipoproteína de baixa densidade (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
ln	- Logaritmo
LPL	- Lipase Lipoproteica
mg	- Miligrama
mL	- Mililitro
n	- Número amostral
NaCl	- Cloreto de sódio
NEFA	- Ácido graxo não esterificado
O₂	- Oxigênio
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
PdX-1	- <i>Pancreatic And Duodenal Homeobox 1</i>
PGC1α	- Receptor ativador proliferador de peroxissomo gama coativador 1 alfa
PIG	- Pequeno para a idade gestacional
PIO	- Pioglitazona
POMC	- Pró-opiomelanocortina
PPAR-α	- <i>Peroxisome proliferator-activated receptor alpha</i>
PPAR-γ	- <i>Peroxisome proliferator-activated receptor gamma</i>
qPCR	- Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real
RC	- Restrição Calórica
RC+GEM	- Restrição Calórica+Gemfibrozila
RC+PIO	- Restrição Calórica+Pioglitazona
RNA	- Ácido Ribonucleico
RPL37a	- Proteína Ribossomal L37
RQ	- Razão da troca respiratória
RXR	- Receptor Retinóico X
SEM	- Erro Padrão da Média
SP	- São Paulo
TG	- Triglicerídeos
TNF-α	- Fator de Necrose Tumoral alpha

TZD	- Tiazolidinedionas
UCP1	- Proteína desacopladora mitocondrial 1
UCP3	- Proteína desacopladora mitocondrial 3
UI	- Unidades Internacionais
Unicamp	- Universidade Estadual de Campinas
VLDL	- Lipoproteína de muito baixa densidade (<i>Very Low Density Lipoprotein</i>)
vs.	- Versus
XdH	- Xantina Desidrogenase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	- Graus celsius
=	- Igual
+	- Mais
±	- Mais ou menos
<	- Menor
/	- Por
%	- Porcentagem
º, º ^a	- Símbolo para numeração ordinal
α	- Alpha
β	- Beta
γ	- Gama
δ	- Delta
®	- Referência

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	22
1.1	CONSEQUÊNCIAS ACARRETADAS PELA IUGR/BPN E AS MELHORIAS NA ASSOCIAÇÃO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA PRÉ E PÓS NATAL.....	22
1.2	IUGR/BPN E OS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO (PPAR).....	26
1.2.1	PPAR α	28
1.2.1.1	GEMFIBROZILA.....	30
1.2.2	PPAR γ	31
1.2.2.1	PIOGLITAZONA.....	33
2.	OBJETIVO.....	34
2.1	OBJETIVO GERAL.....	34
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
3.1	GRUPOS E DESENHO EXPERIMENTAL.....	36
3.2	OBTENÇÃO DE DADOS MATERNOS.....	38
3.3	TESTE DE PRODUÇÃO DE VLDL.....	38
3.4	DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS.....	39
3.5	TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE.....	39
3.6	ANÁLISE DE ADIPOSIDADE POR DEXA.....	39
3.7	CALORIMETRIA INDIRETA EM TERMONEUTRALIDADE.....	40
3.8	INGESTÃO ALIMENTAR E EFICIÊNCIA ALIMENTAR.....	40
3.9	PESAGEM DOS COXINS DE TECIDO ADIPOSEO.....	40
3.10	qPCR.....	41
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4.	RESULTADOS.....	43
4.1	EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO CONSUMO DE GEMFIBROZILA NOS PARÂMETROS MATERNOS.....	43

4.1.1	Massa corporal.....	43
4.1.2	Frações lipídicas.....	44
4.1.3	Níveis hepáticos de TG.....	45
4.1.4	Concentrações de corticosterona.....	46
4.2	IMPACTOS NA PROLE DECORRENTES DA RESTRIÇÃO CALÓRICA COM OU SEM CONSUMO DE GEMFIBROLIZA DURANTE GESTAÇÃO.....	47
4.2.1	Massa corporal das proles fêmeas ao longo da vida	47
4.2.2	Ingestão alimentar.....	48
4.2.3	Composição corporal por DEXA.....	48
4.2.4	Frações lipídicas no primeiro dia de vida.....	50
4.2.5	Frações lipídicas na vida adulta.....	51
4.2.6	Níveis hepáticos de TG.....	52
4.2.7	Produção de VLDL.....	53
4.2.8	Gasto energético e quociente respiratório.....	55
4.2.9	Tolerância à glicose.....	55
4.2.10	Sensibilidade à insulina.....	56
4.2.11	Peso relativo dos diferentes coxins de tecido adiposo e músculo.....	58
4.3	EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO CONSUMO DE PIOGLITAZONA NOS PARÂMETROS MATERNO.....	60
4.3.1	Massa corporal.....	60
4.4	IMPACTOS NA PROLE DECORRENTES DA RESTRIÇÃO CALÓRICA COM OU SEM CONSUMO DE PIOGLITAZONA DURANTE GESTAÇÃO.....	62
4.4.1	Massa corporal ao longo da vida.....	62
4.4.2	Ingestão alimentar.....	63
4.4.3	Gasto energético e quociente respiratório.....	65
4.4.4	Frações lipídicas no primeiro dia de vida.....	66
4.4.5	Frações lipídicas na vida adulta.....	67
4.4.6	Níveis hepáticos de TG.....	68
4.4.7	Tolerância à glicose.....	69
4.4.8	Sensibilidade à insulina.....	70
4.4.9	Peso relativo dos diferentes coxins de tecido adiposo.....	71

4.4.10	Expressão de genes no coxim perigonadal.....	73
4.4.11	Expressão de genes no coxim retroperitoneal.....	75
4.4.12	Expressão de genes no BAT.....	77
5.	CONCLUSÃO.....	82
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83
7.	ANEXOS.....	95

1. INTRODUÇÃO

A gravidez é um período crítico no qual ocorrem diversas modificações metabólicas que são importantes para direcionar o fluxo ideal de nutrientes, hormônios e oxigênio para o crescimento e desenvolvimento adequado do feto. Alterações maternas de natureza nutricional e endócrina podem influenciar o fenótipo na vida adulta, principalmente quando ocorrem no último trimestre da gestação (1). Deste modo, uma restrição do aporte adequado de nutrientes pode ocasionar, por exemplo, a restrição intrauterina de crescimento (IUGR, do inglês *intrauterine growth restriction*).

A IUGR é classificada como um comprometimento do desenvolvimento e crescimento do feto, ocasionando um peso corporal menor do que o esperado para a idade gestacional (levando em consideração fatores como etnia e o sexo) e baixo peso ao nascer (BPN) (2, 3). A IUGR costuma ter múltiplas etiologias, tais como idade materna, estado nutricional, doenças preexistentes, estresse, tabagismo, etilismo e consumo de outras drogas de abuso (4). Além destas causas, há mecanismos que decorrem de características intrínsecas do feto ou uteroplacentárias (redução de nutrientes e oxigênio) (4).

É importante destacar que recém nascidos com BPN (ou microsomia) frequentemente, mas não obrigatoriamente, apresentam peso inferior ao esperado para idade gestacional, o que caracteriza o fenótipo de pequeno para idade gestacional (PIG) (5). A IUGR está normalmente associada à BPN e ao fenótipo PIG.

Estima-se que, a cada ano, cerca de 13,7 milhões de bebês nascidos em países subdesenvolvidos apresentem IUGR, sendo nascimentos a termo ou pré-termo, o que corresponde a aproximadamente 11% da população anual de lactentes nestes países (6).

1.1 CONSEQUÊNCIAS ACARRETADAS PELA IUGR/BPN E AS MELHORIAS NA ASSOCIAÇÃO DA RESTRIÇÃO CALÓRICA PRÉ E PÓS NATAL

Durante décadas tem se estudado os cuidados e a prevenção da IUGR, já que tal condição clínica apresenta forte correlação com mortalidade perinatal, puberdade precoce, distúrbios neurológicos na primeira infância e obesidade, doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) na vida adulta (7-10). Neste sentido, foi demonstrado que a IUGR está relacionada a um aumento nos marcadores de estresse oxidativo, mau funcionamento mitocondrial em ilhotas pancreáticas e diminuição das funções das células β , acarretando a curto e longo prazo intolerância à glicose (11-13).

O estresse oxidativo persiste ao longo da vida, tanto em humanos quanto em animais com IUGR, e se caracteriza pelo resultado das reações de oxirredução devido ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ou pela redução das atividades antioxidantes (13). Este fenômeno pode acarretar em disfunção endotelial em diversos tecidos, gerando prejuízos como fibrose hepática, aumento da adiposidade corporal e disfunções cardiovasculares que podem perdurar por toda vida (14-16).

A contribuição do estresse oxidativo na disfunção endotelial não é o único responsável para as diversas alterações no fenótipo adulto de indivíduos IUGR (13). O excesso de glicocorticoides também se apresenta como um relevante contribuidor. Tal ação pode ocorrer devido à diminuição da atividade da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase que age como barreira placentária aos glicocorticoides maternos (17).

Um estudo prospectivo demonstrou que diversos problemas podem surgir já no primeiro ano de vida de crianças com IUGR/BPN, como resistência à insulina e uma tendência para níveis aumentados de triglicerídeos (TG) quando comparadas a crianças que nasceram com tamanho ideal para idade (18).

As doenças cardiovasculares e as alterações metabólicas podem ser mais intensas a longo prazo em crianças que sofreram IUGR, quando elas são expostas à fatores ambientais e nutricionais inadequados nos primeiros 1000 dias de vida. (19).

Há alguns anos, Barker e colaboradores formularam a hipótese do *thrifty phenotype*, na qual afirmaram que condições adversas na vida intrauterina poderiam levar a alterações definitivas na vida adulta quando associadas às condições ambientais desfavoráveis durante o período pós-natal (20, 21).

A sequência dos fenômenos do *thrifty phenotype* é apresentado na **Figura 1** e observa-se que a má nutrição fetal é o componente central de problemas futuros, tendo como causa principal a desnutrição materna (21).

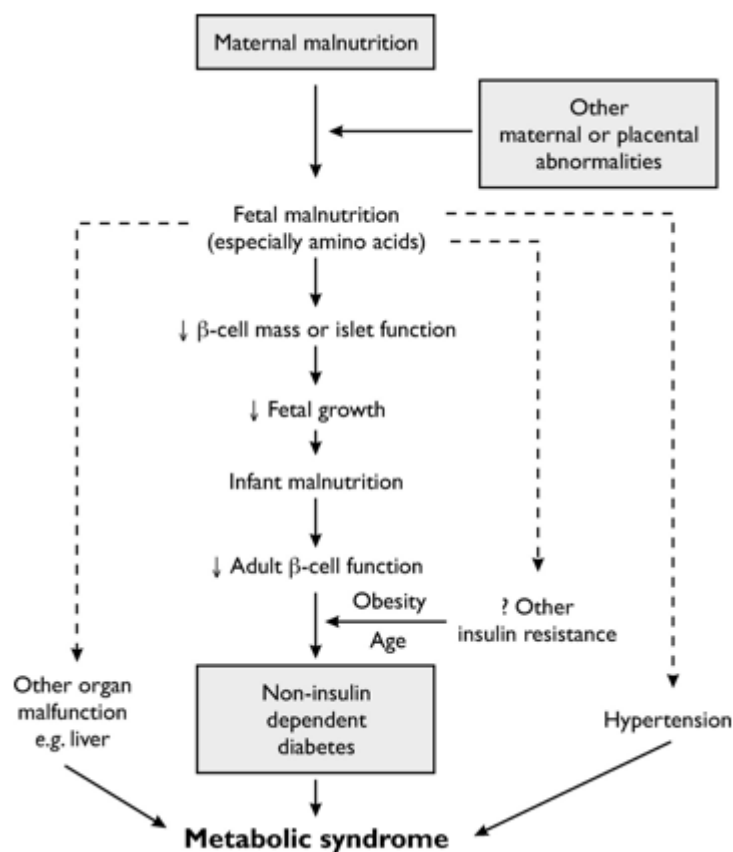


Figura 1: Diagrama do *Thrifty Phenotype*
 Fonte: (21)

Vários estudos posteriores à formulação desta hipótese demonstraram de maneira consistente que o *thrifty phenotype* está de fato associado ao aumento da adiposidade na vida adulta quando há restrição de nutrientes no início da gravidez, seguido de *cach up* de crescimento na vida adulta (22, 23).

A expressão *cach up* se refere a uma aceleração de crescimento que permite que nascidos com IUGR alcancem, na vida adulta, o peso de similares nascidos com o peso normal (24). Este fenômeno pode ser observado em crianças PIG que apresentaram rápida recuperação de peso corporal no período pós-natal (24).

Estudos com roedores nascidos com IUGR que apresentaram *cach up* de crescimento na vida adulta também se mostraram mais susceptíveis ao comprometimento da função hepática, apresentando aumento de TG, colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low density lipoproteins*) quando atingiram a idade adulta (25). Em humanos, observou-se que o aumento da geração do Fator de Crescimento semelhante à Insulina 1 (IGF-1, do inglês *insulin-like growth factor-1*) em crianças com BPN podem

estar associado a resistência à insulina após a recuperação do crescimento, levando à futuros riscos do desenvolvimento de DM2 (26).

Dessa maneira, o *catch up* no peso corporal predispõe ao aumento do risco em desenvolver síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (27). A Federação Internacional de Diabetes (IDF) define síndrome metabólica como um conjunto de fatores que inclui obesidade somada a dois ou mais fatores como: hipertrigliceridemia, lipoproteínas de alta densidade (HDL, do inglês *high density lipoproteins*) reduzido, hipertensão ou diabetes (28).

O mecanismo pelo qual o ganho de peso acelerado leva a alterações metabólicas na vida adulta ainda não está completamente elucidado, porém já é sabido que complexas modificações epigenéticas estão envolvidas em regiões que expressam genes importantes para o crescimento e desenvolvimento do feto (29).

Um dos mecanismos epigenéticos mais estudados é a metilação do DNA, que ocorre em sequências específicas em que há repetições do dinucleotídeo citosina e guanina (denominados de ilhas CpG ou ilhas CG) (30). Estas ilhas são caracterizadas como sequências curtas no genoma que normalmente abrangem regiões promotoras de genes (31). A hipermetilação nestas regiões geralmente está associada redução da expressão gênica, já a hipometilação normalmente leva ao aumento da expressão (30).

Foi proposto que a regulação epigenética via metilação em ilhas de CpG poderiam contribuir para a reprogramação metabólica e que alterações na dieta em períodos ontogênicos críticos geraria um “envelhecimento epigenético” prematuro, causando maior suscetibilidade a doenças crônicas na vida adulta (32, 33).

No trabalho de Park e colaboradores foi observado que ratos com IUGR apresentaram aumento de metilação na região promotora e em histonas do gene *Pdx-1* (*Pancreatic And Duodenal Homeobox 1*), o que acarretou em hipoplasia do pâncreas e desenvolvimento de alterações similares à DM2 (34). Em outro trabalho, foi demonstrado que a restrição de nutrientes na dieta de ratas prenhas resultou em hipometilação e consequente hiperexpressão dos genes que codificam o receptor de glicocorticoide e o *PPARα* no fígado da prole (35). Também foram encontradas modificações epigenéticas, como a metilação das histonas no gene do IGF-1 na prole IUGR com *catch up* de peso corporal (36).

Neste contexto é importante destacar que tanto a prevenção da IUGR quanto o do *cacth up* de peso corporal na vida pós-natal podem ser favoráveis no impedimento das alterações metabólicas na vida adulta.

A ausência da recuperação de crescimento no período pós-natal demonstra que, apesar da prole permanecer pequena por toda a vida, pode-se evitar o desenvolvimento de intolerância à glicose na vida adulta (37). Em outro trabalho, os animais com IUGR que não sofreram *catch up* de crescimento apresentaram-se normotensos na idade adulta (38).

Ainda em modelos animais, quando a RC intrauterina é mantida no período pós-natal, a prole permanece pequena, metabolicamente flexível e altamente sensível à insulina ao longo de toda vida (39).

Com base no exposto acima, é premente a necessidade de se descreverem alternativas que possam possibilitar o *catch up* de peso corporal em proles com IUGR sem a indução de alterações metabólicas, tais como intolerância à glicose e hipertrigliceridemia.

1.2 IUGR/BPN E OS RECEPTORES ATIVADOS POR PROLIFERADORES DE PEROXISSOMO (PPAR)

Os receptores nucleares são a maior superfamília de fatores de transcrição induzidos por ligantes (40). Em seres humanos, são representados por 48 membros desta família enquanto que em camundongos são 49 (40, 41). Para fins de simplificação, faz-se uma classificação em diferentes subcategorias; receptores de esteróides, heterodímeros do receptor retinóico X e receptores órfãos homodiméricos e monoméricos (40, 41). A subcategoria dos heterodímeros do receptor retinóico X inclui o receptor de hormônio tireoidiano e os Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomo (PPAR) (42).

Desde os anos 90, os PPAR se tornaram potenciais alvos de pesquisa com o intuito de encontrar tratamentos eficientes para as mais variadas doenças (43). Esta busca foi estimulada em decorrência da descrição dos grupos de genes alvo desses receptores, que desempenham papéis chave em rotas metabólicas e de desenvolvimento celular (44).

Alguns estudos sugeriram que a ativação dos PPARs é essencial para a progressão da gestação e do desenvolvimento fetal, uma vez que roedores recém-nascidos com IUGR apresentam expressão hepática diminuída de PPAR α e PPAR γ , contribuindo para a inflamação programada induzida pela obesidade (45). Outros trabalhos mostraram que a ativação farmacológica do PPAR γ foi necessária para o desenvolvimento placentário e

diferenciação de trofoblastos, além de melhorar o controle da pressão arterial e reverter a disfunção endotelial em ratos nascidos de mães com pré-eclâmpsia (46, 47).

Os PPARs possuem a capacidade de regular a expressão de genes do metabolismo, diferenciação e proliferação celular (48, 49).

A ativação dos PPARs (**Figura 2**) é mediada por diversos ligantes que podem ser endógenos (ácidos graxos e derivados eicosanóides) e/ou exógenos (fármacos). Após a ligação, o PPAR se transloca para o núcleo e forma um heterodímero com o receptor retinóico X. Este heterodímero irá se ligar ao elemento responsivo ao proliferador de peroxissomo (PPRE) (50-52). A heterodimerização também recruta coativadores que desempenham atividade de histona acetilase, o que aumenta a capacidade transcrricional sobre os genes alvos (51). Em um período de inativação, o PPAR sofre influências de correpressores que possuem atividade de histona desacetilase (52).

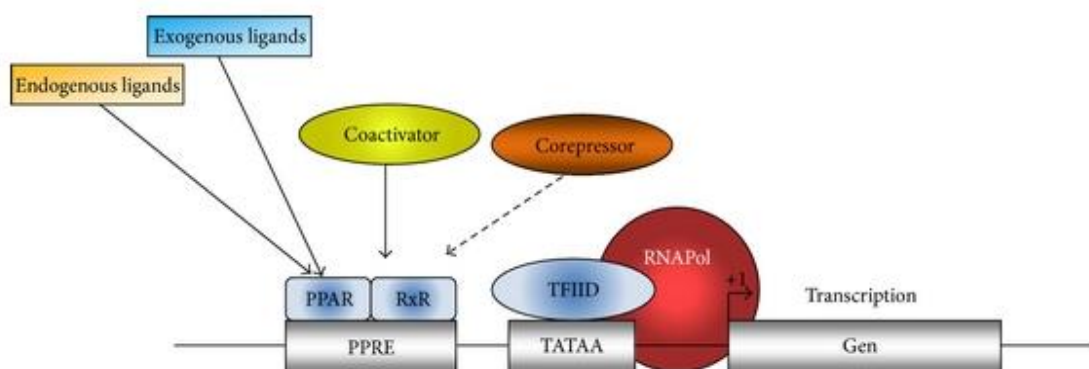


Figura 2 – Mecanismo de ativação do PPAR
Fonte: (52)

Existem três isoformas de PPAR; α (alpha), β/δ (beta/delta) e γ (gamma). Essas isoformas são estruturalmente semelhantes, porém são distintas quanto às funções e a distribuição nos tecidos (47).

O PPAR α é expresso predominantemente no fígado, músculo esquelético e coração e sua ativação está envolvida no aumento da oxidação de ácidos graxos e diminuição dos níveis lipídicos (53). Os ligantes exógenos são pertencentes da classe terapêutica dos fibratos.

O PPAR β/δ é considerado onipresente, sua ativação farmacológica através dos agonistas GW0742 ou GW501516 induz vasodilatação, melhora a disfunção endotelial e reduz a inflamação, além de estimular o catabolismo dos ácidos graxos, metabolismo energético, termogênese, sensibilidade à insulina e transporte de colesterol (54, 55).

O PPAR γ é o subtipo mais estudado e sua expressão tem predominância no tecido adiposo branco e marrom, porém é encontrado em outros tecidos em menor dominância, como no coração, intestino, músculo esquelético e fígado (56). Também desempenha um papel muito importante nos processos metabólicos de diferenciação e proliferação celular e no metabolismo de lipídico (47). Os ligantes farmacológicos do PPAR γ são pertencentes à classe das Tiazolidinedionas (TZDs).

De forma geral, as três isoformas dos PPARs desempenham um papel central na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos (**Figura 3**). Isso se tornou muito atraente para a indústria farmacêutica, pois surgia a possibilidade de novos alvos terapêuticos para o tratamento de doenças como DM2, obesidade, hipertensão e síndrome metabólica (57).

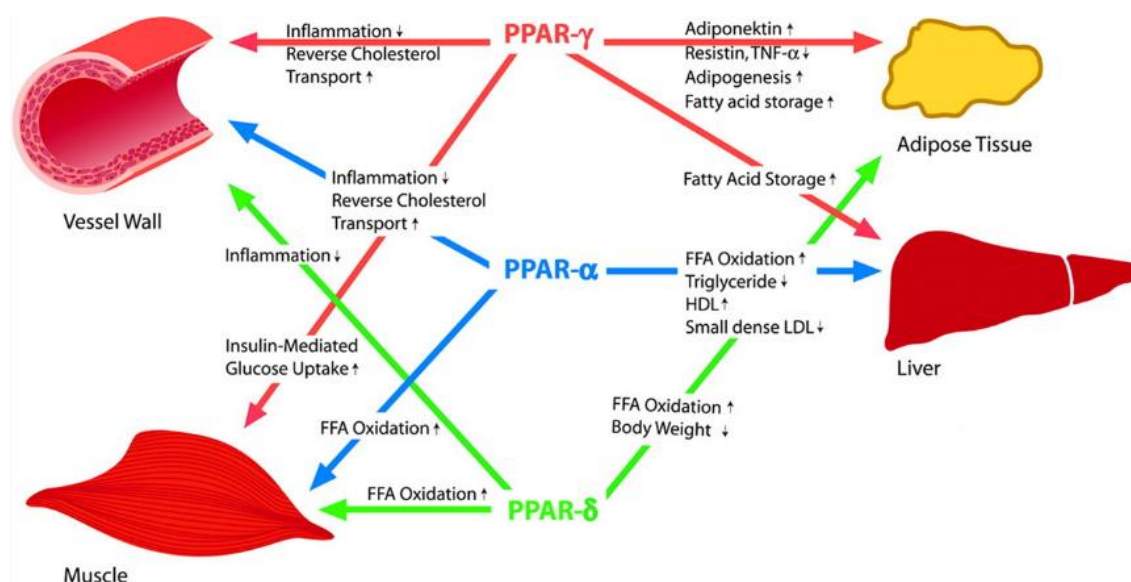


Figura 3 – Funções das 3 isoformas dos PPARs nos diferentes tecidos.

Fonte: (58)

1.2.1 PPAR α

O PPAR α foi o primeiro receptor nuclear a ser identificado e recebeu tal nomenclatura pela capacidade de induzir a proliferação de peroxissomos em roedores, porém mais tarde foi verificado que essa capacidade não ocorria nos humanos (59).

Nas últimas décadas, o PPAR α foi classificado como crucial para a regulação do metabolismo hepático durante períodos de jejum por possuir a capacidade de induzir a oxidação e a cetogênese dos ácidos graxos e regular a produção de glicose (60, 61).

Estudos utilizando modelos animais mostraram que o PPAR α comanda a expressão de genes envolvidos no metabolismo das lipoproteínas, bem como em genes hepáticos que são responsáveis pela captação, ligação, ativação, alongamento e dessaturação de ácidos graxos, além da esterificação e hidrólise de triglicerídeos (TG) e gotículas de lipídeos (62).

A **Figura 4** ilustra o papel do PPAR α no controle metabólico de diversos processos ocorridos no fígado. Além das alterações presentes no metabolismo hepático de animais, também pode observar genes envolvidos na gliconeogênese, metabolismo de ácidos biliares e a regulação negativa de vários genes implicados em vias referentes à imunidade (62).

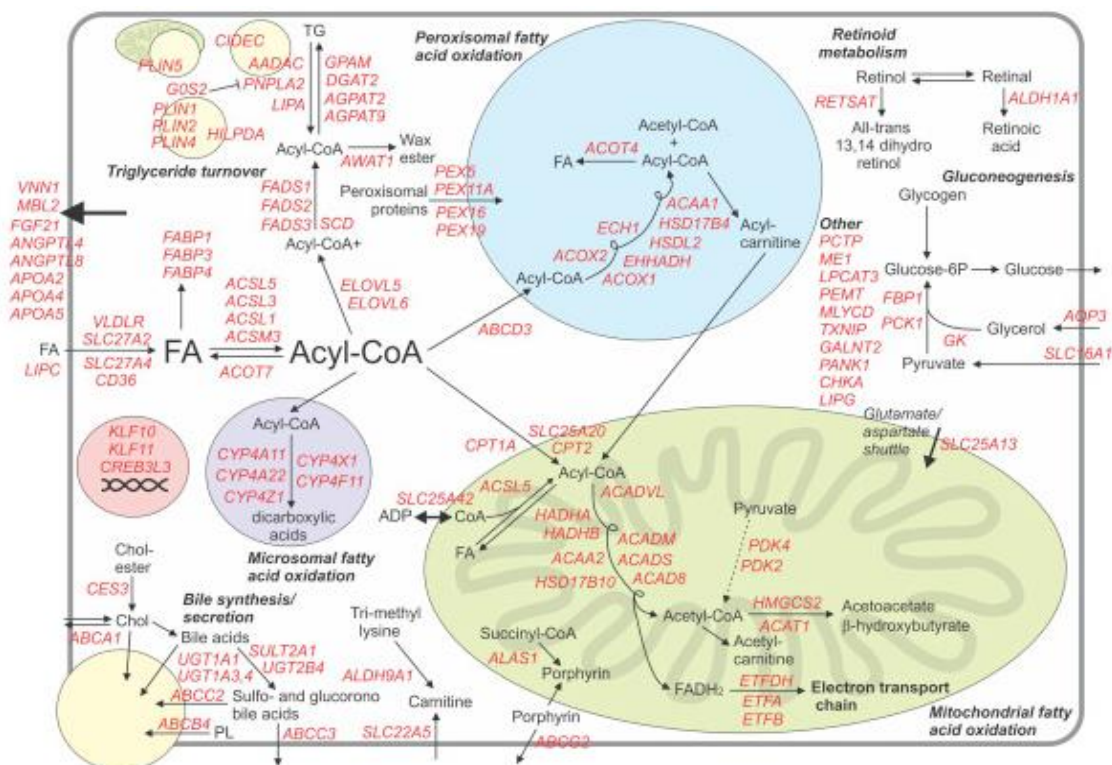


Figura 4 – Genes alvo do PPAR α no fígado humano.
Fonte: (62)

Os ligantes exógenos dos PPAR α , também chamados de agonistas de PPAR α , fazem parte da classe dos fibratos representados pela gemfibrozila (GEM), clofibrato, fenofibrato e ácido fenofrítrico. Eles possuem a capacidade de aumentar os níveis de HDL e são usados no tratamento das hipertrigliceridemias (63).

1.2.1.1 GEMFIBROZILA

A GEM se apresenta na forma de pó branco ou quase branco, cristalino, praticamente insolúvel em água e solúvel em metanol e álcool etílico (64). É proveniente do ácido fenoxipentanóico não halogenado e o medicamento referência encontrado no mercado recebe o nome de Lopid® (64). Este fibrato é aprovado por diversas agências regulatórias inclusive pelo *Food and Drugs Administration* (FDA) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (65, 66).

Estruturalmente é composto por um ácido carboxílico anfipático, quimicamente denominado como Ácido 5-(2,5-dimetilfenoxi)-2,2-dimetilpentanoico, que se apresenta como uma molécula anfipática, ao possuir um alquibenzeno longo e um grupo carboxílico carregado negativamente na extremidade (**Figura 5**) (64, 65).

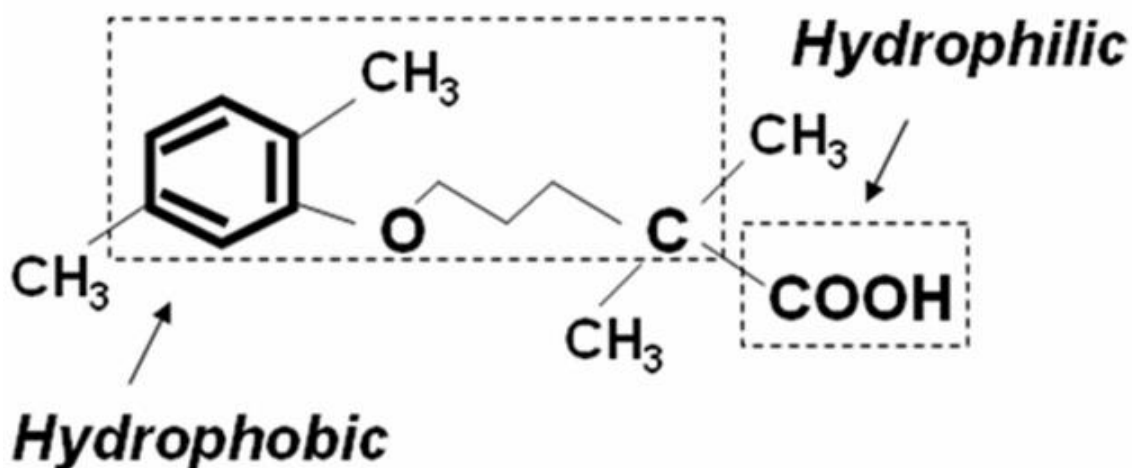


Figura 5 – Estrutura química do fármaco GEM
Fonte: (65)

Desde meados dos anos 70, a GEM entrou no mercado como um excelente medicamento hipolipidêmico. Com o passar dos anos e a realização de diversas pesquisas, não é mais o medicamento de primeira escolha, devido aos inúmeros efeitos colaterais como angina, lesão hepática, miosite, miopatia, rabdomiólise e insuficiência renal (65, 67).

Atualmente, a GEM é usada no tratamento das hiperlipidemias primárias do tipo IV (que se caracterizam pelo fenótipo de aumento de lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL, do inglês *very low density lipoprotein*), TG e colesterol normal ou

levemente aumentando), e do tipo V (que apresentam aumento de VLDL e quilomícron, TG e colesterol levemente aumentando) (68).

Já é sabido que a GEM tem outras atividades biológicas além da redução dos lipídeos via PPAR α . Estudos demonstram a eficácia do fármaco no tratamento da aterosclerose, diabetes e na doença de Alzheimer (69-71).

O mecanismo de ação da GEM se baseia na ativação do PPAR α , que tem a capacidade de diminuir a produção hepática das VLDL através da diminuição da síntese de TG, que pode ocorrer em parte pela diminuição da lipólise do tecido adiposo e pela liberação de ácidos graxos livres (66, 72, 73). A posologia recomendada é de 600mg por via oral a cada 12 horas (72).

Em relação à farmacocinética, a GEM apresenta uma metabolização hepática, com alta ligação às proteínas plasmáticas (99%) e a excreção é predominantemente renal (72).

Apesar de não apresentar evidências teratogênicas, é recomendada que seja usada com cautela durante a gestação devido a classificação C pelo FDA. Em um estudo com ratas e coelhas, foi observado que a administração de GEM não provocou efeitos teratogênicos quando utilizada nas doses de 92 a 331 mg/kg. Observou-se apenas redução do peso dos filhotes (74).

1.2.2 PPAR γ

A resposta fenotípica da adipogênese decorrente da ativação do PPAR γ tem atraído intenso interesse científico (75). Além deste papel, a ativação do PPAR γ é crucial para a manutenção do fenótipo do adipócito já diferenciado, estimulando a expressão de genes como a lipase lipoproteica (LPL) e transportadores de ácidos graxos e glicerol, que favorecem o estoque de TG, ao invés da liberação destes para a circulação (76).

O PPAR γ apresenta dois subtipos, o PPAR γ 1 e PPAR γ 2, sendo que apenas o último responde a ligantes endógenos para aumentar a lipogênese. Entretanto, ambos tipos são ativados por ligantes farmacológicos de aplicabilidade terapêutica. Em humanos, a expressão de PPAR γ 2 no tecido adiposo subcutâneo correlaciona-se diretamente com o índice de massa corporal (IMC), ao passo que, a expressão de PPAR γ 1 apresenta correlação inversa (77).

Do ponto de vista terapêutico, os impactos metabólicos decorrentes da ativação do PPAR γ são explorados pelo uso de agonistas exógenos pertencentes à classe das TZD.

A pioglitazona (PIO) e a rosiglitazona são os dois fármacos pertencentes a esta classe atualmente disponíveis para o tratamento do DM2. No ano de 2010, a ANVISA descontinuou todos os medicamentos contendo o princípio ativo rosiglitazona no território brasileiro, pois estudos demonstraram alta probabilidade de ocorrência de doenças isquêmicas em seus usuários, o que tornou seu uso desfavorável em relação ao risco/benefício (78).

Além de resultar em um balanço positivo para o estoque de TG no tecido adiposo, as TZD não acarretam no aumento do volume médio dos adipócitos, isto porque a ação é simultânea à indução de adipogênese, levando ao aumento no número de adipócitos com volume médio menor (79).

Um estudo recente mostrou que a melhora na sensibilidade à insulina observada em pacientes que usam agonistas de PPAR γ é secundária ao aumento da expressão de adiponectina e uma menor liberação de ácidos graxos para a circulação, o que leva ao aumento da sensibilidade à insulina nos tecidos musculares e hepático (80).

É importante destacar que o aumento da sensibilidade sistêmica à insulina causada pelas TZDs é acompanhado de ganho de peso e retenção de volume, além de uma redução do acúmulo de gordura intra miofibrilar em diversos grupos musculares (81, 82).

A ação direta das TZDs no tecido adiposo tem um evidente apelo racional para compreensão dos efeitos terapêuticos. Apesar disto, estudos acumulados nas últimas duas décadas mostram que estes agonistas de PPAR γ atuam, na verdade, em vários outros tipos celulares modulando diversas respostas fisiológicas e patológicas. Por exemplo, as TZDs agem diretamente em macrófagos diminuindo sua atividade inflamatória (77). Alguns achados também sugerem que a ativação de PPAR γ tem um potencial supressor de crescimento de tumores de colo de útero (83).

1.2.2.1 PIOGLITAZONA

A descoberta da PIO se deu através de estudos de formulação para aumentar a potência do composto (ciglitazona) de posse da empresa *Takeda Pharmaceuticals*. Após algumas melhorias direcionadas no aumento do potencial de modular a sensibilidade à insulina, surgiu a AD-4833 – atualmente conhecida como pioglitazona (84).

A PIO é sintetizada na forma de cloridrato e se apresenta como um pó branco, inodoro, insolúvel em água e em éter, parcialmente solúvel em álcool etílico e totalmente

solúvel em dimetilsulfóxido (DMSO). Sua estrutura molecular é demonstrada na **Figura 6** e é caracterizada em $C_{19}H_{20}N_2O_3S$ (85).

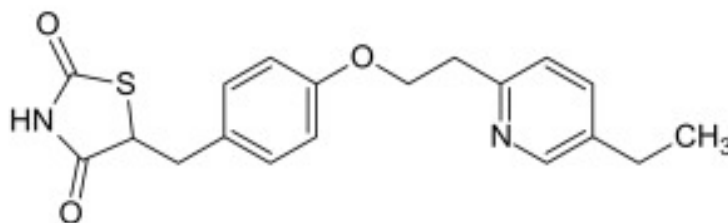


Figura 6 – Estrutura da Pioglitazona
Fonte: (85)

A PIO está em comercialização desde meados dos anos 2000, quando foi aprovada pelo FDA e permanece até os dias atuais como medicamento referência denominado Actos®, usada em monoterapias ou combinações orais para o tratamento da DM2, nas doses que variam de 15 a 45 mg/dia (86).

O mecanismo de ação da PIO depende da ativação do $PPAR\gamma$, que leva a um aumento da sensibilidade periférica à insulina nos adipócitos e no fígado. Entretanto, estudos revelam que as respostas à PIO *in vivo* variam de acordo com situações ambientais e estado de saúde do indivíduo. Além disso, a eficácia da droga é alterada pelo sexo, sendo mais eficientes em mulheres (86-88).

Não há estudos que demonstram a segurança do uso da PIO durante a gestação. De acordo com o FDA, o cloridrato de PIO recebe classificação C para uso na gestação, ou seja, é necessária a avaliação dos benefícios sobre um possível risco na mãe ou no feto. Estudos sobre reprodução animal não relataram teratogenicidade em filhotes de ratas e coelhas que receberam doses de até 20 a 75 vezes maiores que a dose terapêutica recomendada, porém foi observado que a PIO aumentou a embriotoxicidade, caracterizado por perdas pós-implante, redução do peso fetal e atraso no parto (89).

Não há informações contundentes sobre a segurança do uso da PIO durante a lactação, porém acredita-se que, devido a sua alta ligação às proteínas, existe uma probabilidade baixa que os metabólitos ativos sejam excretados através do leite materno (90).

Neste cenário, formulamos a hipótese de que o tratamento materno com GEM ou PIO pode proporcionar à prole nascida e amamentada por mães expostas à RC, um *catch up* de peso corporal na vida adulta sem programação metabólica desfavorável.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é esclarecer se o uso de agonista do PPAR α (GEM) ou agonista do PPAR γ (PIO) em mães expostas à RC durante a gestação e lactação é capaz de programar um ganho de peso corporal adequado (*catch up* de peso corporal) na prole sem promover alterações metabólicas similares às de síndrome metabólica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a massa corporal de mães expostas à RC com ou sem GEM.
- Investigar o perfil lipídico no 15° e 20° Dia de Gestação (DG) de mães expostas à RC com ou sem GEM.
- Analisar a concentração de TG hepático no 15° e 20° DG de mães expostas à RC com ou sem GEM
- Investigar as concentrações maternas de corticosterona em mães expostas à RC com ou sem GEM.
- Determinar a massa corporal e ingestão alimentar ao longo da vida da prole fêmea nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de GEM.
- Analisar o gasto energético e composição corporal da prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de GEM.
- Verificar o peso dos coxins retroperitoneal, perigonadal e do tecido adiposo marrom (BAT) da prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de GEM.
- Investigar as frações lipídicas no 1° dia de lactação e na vida adulta da prole fêmea nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de GEM.
- Analisar a concentração de TG hepático e a produção de VLDL na prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de GEM.
- Verificar o metabolismo glicídico através do teste de tolerância à glicose (GTT) e do teste de tolerância à insulina (ITT) na prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de GEM.
- Determinar a massa corporal das mães expostas à RC com ou sem PIO.

- Determinar a massa corporal e ingestão alimentar ao longo da vida da prole fêmea nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de PIO
- Analisar o gasto energético da prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de PIO.
- Investigar as frações lipídicas no 1º dia de lactação e na vida adulta da prole fêmea nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de PIO.
- Analisar a concentração de TG hepático na prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de PIO.
- Verificar o metabolismo glicídico (teste de tolerância à glicose – GTT e teste de tolerância à insulina – ITT) na prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de PIO.
- Verificar o peso e analisar a expressão de genes relacionados ao metabolismo de lípedes nos coxins retroperitoneal e perigonadal e no tecido adiposo marrom (BAT) da prole fêmea adulta nascida de mães expostas à RC com ou sem tratamento de PIO.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 GRUPOS E DESENHO EXPERIMENTAL

Foram usados fêmeas e machos de ratos Wistar fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da mesma instituição, sob a temperatura média de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e com ciclos de 12 horas de luminosidade, sendo o período claro das 07:00 às 19:00 horas. Ao atingirem 13 semanas de idade, as fêmeas foram acasaladas com machos (da mesma idade) na disposição de duas ratas por um rato por gaiola.

Depois de dois dias, os machos foram retirados, as fêmeas pesadas e foi considerado o 2° dia gestacional (DG). No 11° DG, todas as ratas foram novamente pesadas e, no caso de um ganho de peso superior a 14 gramas (g), elas foram consideradas prenhas. Em seguida, foram individualizadas e distribuídas aleatoriamente em cada um dos grupos experimentais. Pela nossa experiência, esta estratégia de seleção de prenhas está associada com uma taxa de fertilidade de 60% e é usada para evitar o estresse que seria causado para se obter o lavado vaginal.

A partir do 11° DG, as ratas foram divididas nos grupos experimentais a depender da quantidade de ração oferecida e do tratamento incorporado na ração. O grupo controle (CTL) continuou recebendo ração *ad libitum* até o final da gestação. O grupo com restrição calórica (RC) recebeu uma quantidade de ração equivalente a 50% do consumo diário do grupo CTL entre o 11° DG e o 21° dia de lactação (DL) (91) (este montante correspondeu a valores aproximados a 9g durante a gestação, 11g no início da lactação e 16g a partir do 7° DL). A quantidade de ração consumida pelo grupo CTL foi medida diariamente para fins de cálculo da quantidade a ser ofertada ao grupo RC (atualizada diariamente). O grupo restrição calórica + gemfibrozila (RC+GEM) recebeu a mesma quantidade de ração que o grupo RC, porém incorporada com GEM. A dose final de GEM foi de 90 mg/kg/dia incorporados na ração por dissolução prévia em solução alcoólica (92, 93). Os pellets incorporados com GEM foram submetidos a secagem do solvente antes de serem ofertados às ratas.

O volume da solução de GEM (25 mg/ml) incorporado na ração foi ajustado semanalmente de acordo com a **equação 1**. Após o parto, todas as proles foram ajustadas para a proporção de 6 filhotes por lactante (4 fêmeas e 2 machos).

$$\text{Volume de solução de Gemfibrozila para impregnação na ração (mL)} = \frac{90 \text{ mg}}{\text{kg}} \times \text{Peso da rata (Kg)} \div \text{Concentração de solução de Gemfibrozila (mg/mL)}$$

eq. 1: Concentração de GEM foi ajustada diariamente com base no peso da rata no dia do ajuste e na quantidade de ração ingerida durante o dia anterior. Tal ajuste foi feito para manter a dose de 90 mg/kg durante todos os dias do tratamento.

Para os experimentos em que se avaliou a ação da PIO, o cálculo usado para o ajuste de dose foi similar àquele realizado para a GEM. O grupo restrição calórica + pioglitazona (RC+PIO) recebeu a mesma quantidade de ração que o grupo RC, porém incorporada com PIO. O grupo apenas com PIO foi tratado com PIO sem RC e recebeu a mesma quantidade de ração que o CTL. A dose final de PIO foi de 10 mg/kg/dia, incorporados na ração por dissolução prévia em solução alcoólica. (93-95)

O volume da solução de PIO (3 mg/ml) incorporado na ração foi ajustado semanalmente de acordo com a **equação 2**. Após o parto, todas as proles foram ajustadas para a proporção de 6 filhotes por lactante (4 fêmeas e 2 machos).

$$\text{Volume de solução de Pioglitazona para impregnação na ração (mL)} = \frac{10 \text{ mg}}{\text{kg}} \times \text{Peso da rata (Kg)} \div \text{Concentração de solução de Pioglitazona (mg/mL)}$$

eq. 2: Concentração de pioglitazona foi ajustada diariamente com base no peso da rata no dia do ajuste e na quantidade de ração ingerida durante o dia anterior. Tal ajuste foi feito para manter a dose de 10 mg/kg durante todos os dias do tratamento.

Todas as proles geradas foram desmamadas aos 21 dias de vida e mantidas com ração padrão *ad libitum* até os dias dos experimentos. Neste momento, foram mantidas as fêmeas e os machos foram sacrificados por aprofundamento de anestesia utilizando tiopental sódico.

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UNICAMP (CEUA–protocolo nº 4343-1/2016, 5007-1/2018).

3.2 OBTENÇÃO DE DADOS MATERNOS

As mães dos grupos CTL, RC e RC+GEM foram sacrificadas por decapitação após anestesia com tiopental sódico no 15º e no 20º DG. O sangue foi coletado do tronco e o soro foi extraído para dosagem de corticosterona com kits de ELISA (IBL INTERNATIONAL GMBH) e dosagem de TG e colesterol total por método enzimático/colorimétrico (LABORLAB).

A dosagem de TG hepático foi realizada após aplicação de método modificado de extração lipídica de *Folch*.

O método modificado de *Folch* foi realizado da seguinte maneira: um fragmento de fígado (aproximadamente 50 mg de tecido) foi homogeneizado em solução de clorofórmio/metanol (2:1) e mantido em geladeira sob agitação *overnight*. No dia seguinte, foi acrescentada solução de NaCl a 0,6% e as amostras foram centrifugadas a 4°C por 20 minutos. Retirou-se a fase líquida inferior, que foi transferida para novo tubo, o qual foi submetido a evaporação total do solvente. A fração de ésteres teciduais foi ressuspendida em 100 µL de isopropanol e, em seguida, submetida à determinação da concentração de TG por método enzimático/colorimétrico (96, 97).

3.3 TESTE DE PRODUÇÃO DE VLDL

O teste de produção de VLDL foi realizado nas proles de mães CTL, RC e RC+GEM ao atingirem o terceiro e o sexto meses de vida. O teste, baseado em metodologia previamente descrita (98), foi realizado às 8:00 da manhã depois de um jejum de 12 horas. Os animais foram submetidos a uma incisão na extremidade da cauda para a coleta do sangue, que foi utilizado para extração de soro e dosagem de TG pelo método enzimático. Foi feita uma coleta antes (basal - min 0) e 60, 120, 180 e 360 minutos após a injeção intraperitoneal de solução com Tyloxapol 20% (Triton WR-1339) na dose de 0,5 g/kg.

3.4 DETERMINAÇÃO DAS FRAÇÕES LIPÍDICAS

Foram feitas análises de TG e colesterol total no soro das proles no primeiro dia e no sexto mês de vida. O TG e colesterol total do soro foram determinados com kits enzimáticos/colorimétricos (LABORLAB).

3.5 TESTE DE TOLERÂNCIA À INSULINA E TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE

Os testes foram realizados nas proles ao atingirem o sexto mês de vida. O teste de tolerância à insulina (ITT) e o teste de tolerância à glicose (GTT) foram realizados de acordo com metodologias já padronizadas em nosso laboratório (99).

Para o ITT, os animais foram jejuados por 12 horas e, em seguida, receberam uma injeção intraperitoneal com insulina (2 UI/kg). A glicemia foi medida antes e 5, 10, 15, 20, 25 e 30 min após a injeção. A coleta de sangue foi feita através de incisão na extremidade da cauda. Os valores da glicemia foram convertidos para escala logarítmica na base *e*. Em seguida, a inclinação da reta (ln da glicemia vs. tempo) foi calculada. Este valor em módulo multiplicado por 100 foi assumido como a constante de decaimento de glicose após sobrecarga de insulina (K_{ITT}).

Para a realização do GTT, os animais foram jejuados por 12 horas e, em seguida, receberam uma injeção intraperitoneal com glicose (2 g/kg). A glicemia foi medida antes e 5, 10, 15, 30, 60 e 120 min após a injeção. A coleta de sangue foi feita através de incisão na extremidade da cauda. A área sob a curva (glicemia vs. tempo) foi calculada como parâmetro de tolerância à glicose.

Em todos os testes a medida da glicemia foi realizada utilizando o glicosímetro da marca On Call® Plus.

3.6 ANÁLISE DE ADIPOSIDADE POR DEXA

Ao atingirem 20-22 semanas de vida, as fêmeas das proles CTL, RC e RC+GEM foram submetidas a jejum de 12 horas, anestesiadas (40 mg/kg de tiopental) e analisadas em aparelho de *Dual Energy X-ray Absorptiometry* (DEXA) (Série Discovery Wi QDR; Hologic Apex Software, Hologic Inc.) para aquisição das imagens (em torno de 90 segundos por animal). A partir das análises das imagens, foram obtidas as porcentagens de gordura, de massa magra e de massa óssea de cada animal.

3.7 CALORIMETRIA INDIRETA EM TERMONEUTRALIDADE

Ao atingirem 24-26 semanas de vida, as fêmeas das proles foram encaminhadas para a análise no respirômetro. O consumo de oxigênio e a produção de dióxido de carbono, bem como a taxa de troca respiratória, foram medidos durante três ciclos claro/escuro (72h) e em termoneutralidade ($30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$) usando um sistema de calorimetria indireta de circuito aberto controlado por computador (LE405 gas analyser; Panlab-Harvard Apparatus). As medidas foram feitas com água e alimentação *ad libitum*. Os dados das primeiras 48 horas foram descartados. O fluxo de ar dentro de cada câmara foi monitorado por sensores (Air Supply and Switching; Panlab-Harvard Apparatus). O consumo de O_2 e a produção de CO_2 foram usados como base para o cálculo do gasto energético relativo ao peso do animal pela equação de Withers. A razão de troca respiratória (RQ) foi calculada utilizando-se a razão direta da produção de CO_2 pelo consumo de O_2 . Para estes cálculos, foi usado o software *Metabolism* versão 2.2 (100, 101).

3.8 INGESTÃO ALIMENTAR

As ingestões alimentares diárias das fêmeas foram medidas na 7^a, 12^a, 16^a, 20^a e 24^a semanas de vida.

3.9 PESAGEM DOS COXINS DE TECIDO ADIPOSEO

As proles foram anestesiadas e sacrificadas por decapitação na 27^a semana de vida. Em seguida, foram retirados os coxins de tecido adiposo branco retroperitoneal e perigonadal e de tecido adiposo marrom inter-escapular (doravante chamado de BAT – *Brown Adipose Tissue*). Todos os coxins foram removidos de linfonodos e grandes vasos, pesados e congelados para análises posteriores.

3.10 qPCR

O RNA total foi extraído de 150 mg dos tecidos adiposos perigonadal, retroperitoneal e do BAT usando-se Qiazol. A concentração de RNA foi medida usando um espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Alíquotas contendo 1 μg de RNA foram submetidas a transcrição reversa usando um kit

específico (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações utilizaram APPLIED BIOSYSTEMS FAST SYBR GREEN Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), num sistema de PCR em Tempo Real StepOnePlus (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A especificidade das reações foi verificada pela análise da curva de *Melting*.

As sequências de primers utilizados estão listados na **Tabela 1**.

PPAR γ	Sense: GAACGTGAAGCCCATCGAGG
	Antisense: GGAACACTTTGTCAGCGACTGG
PGC1 α	Sense: CCCATACACAACCGCAGTCG
	Antisense: CTTCTTTCTCGTGTCTCTCG
UCP1	Sense: GTGACCCACCACATACTGGCAG
	Antisense: GGTACACTTGGGTACTGTCTCTGG
FASN	Sense: TGGTGAAGCCCAGAGGGATC
	Antisense: CACTTCCACACCCATGAGCG
LPL	Sense: TTTCTCTGTATGGCACAGTGGC
	Antisense: TCGATGACAAAGCTGGGACTG
CD36	Sense: TCTTCCAGCCAACGCCTTTGC
	Antisense: TGCACCTGCCAATGTCCAGCAC
DGAT1	Sense: AGGATGTTCCGCCTTTGGG
	Antisense: CGTGGACATACATGAGCACAGC
DGAT2	Sense: AAGCCCATCACCACCGTTG
	Antisense: TTCCTTCCAGGAGCTGGCAC
CPT1	Sense: ATTCCAGGAGAGTGCCAGGAGG
	Antisense: CCCATGTCCTTGTAATGTGCGAG
CideA	Sense: GCTGTCTCAATGTCAAAGCCAC
	Antisense: TCTGTGTCACCCAGTGCTCG
CideC	Sense: TATCCCTTTCCCAGAAGCCAAC
	Antisense: CATTTCTTCAGGATGCGTTTG
XdH	Sense: TGCCATCAAAGATGCCATTCG
	Antisense: ACACAGGGTGGTGAAGTGGTCC
DIO2	Sense: GGACCGATGTGCTGCAGCCC
	Antisense: GGCGTGAGCTTCTTCAATGTA

RPL37a	Sense: CAAGAAGGTCGGGATCGTCG
	Antisense: ACCAGGCAAGTCTCAGGAGGTG

Tabela 1 – Sequência de primers de ratos utilizados para análise da expressão gênica dos coxins adiposos perigonadal, retroperitoneal e BAT.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (SEM). Os valores foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk) e comparados estatisticamente por análise de variância de uma (*one way* ANOVA) ou de duas vias (*two way* ANOVA) com pós-teste de *Tukey*. Para todos os resultados, foram adotados 5% como limite de significância estatística ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO CONSUMO DE GEMFIBROZILA NOS PARÂMETROS MATERNOS

4.1.1 Massa corporal

No primeiro dia de tratamento, equivalente ao 11° DG, foi possível observar que a massa das mães pertencentes aos diferentes grupos experimentais não foram diferentes entre si. Durante a lactação, de maneira geral, observou-se uma redução da massa das mães que receberam RC, independente de terem recebido ou não GEM.

No 1° DL, ocorreu uma redução de 11,4% na massa das mães RC e de 12,1% na massa das mães RC+GEM (vs. CTL; $p<0,01$ e $p<0,05$). No 8° DL, esta redução foi de 21,3% nas mães RC e de 19,9% nas RC+GEM (vs. CTL; $p<0,0001$). No 15° DL, esta redução foi de 17,1% nas RC e de 18,5% nas mães RC+GEM (vs. CTL; $p=0,01$). Já no 21° DL, a redução da massa corporal foi de 19,8% nas mães RC e de 22,7% nas mães RC+GEM (vs. CTL; $p<0,01$ e $p<0,0001$).

Até o momento, não foram encontrados na literatura trabalhos que correlacionam a exposição da GEM e o peso das ratas prenhas e/ou lactantes. Porém, o estudo de Palkar e colaboradores demonstrou que a administração do clofibrato durante a gestação não afetou o peso ou o ganho de peso das ratas (102).

Dessa maneira, observando nossos resultados, a GEM também não foi capaz de alterar o peso das mães que foram expostas à RC.

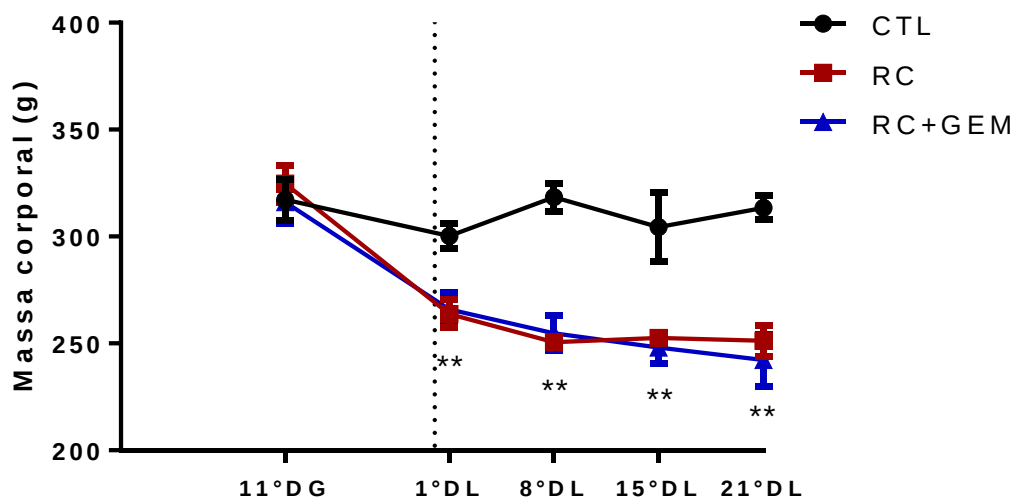


Figura 7 - Massa corporal (g) das mães CTL (n= 5), RC (n= 4-5) e RC+GEM (n= 6) no 11° DG, 1° DL, 8° DL, 15° DL e 21° DL. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: ** $p<0,01$; ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.1.2 Frações lipídicas

As concentrações de TG estavam reduzidas em 58,2% nas mães RC e em 63,2% nas mães RC+GEM no 15° DG (vs. CTL; $p<0,0001$) (**Fig. 8A**). No 20° DG, ocorreu uma redução de 40,3% nas concentrações de TG das mães RC+GEM (vs. CTL; $p<0,05$), o que não foi observado nas mães do grupo RC (**Fig. 8C**). As concentrações de colesterol total não foram modificadas no 15° DG (**Fig. 8B**) e nem no 20° DG (**Fig. 8D**).

Em conjunto, estes dados mostraram que o uso de GEM não foi capaz de causar uma redução adicional da concentração de TG em grávidas no pico da gestação (15° DG) já expostas a uma RC. Deste modo, podemos interpretar que, na medida em que a gestação avança, as alterações metabólicas da gestação se sobrepõem àqueles efeitos impostos pela RC.

O final da gestação é o momento em que ocorre grande mobilização de TG para o sangue, que pode ser mediada por uma redução da atividade da LPL em tecido adiposo branco e fígado (103). Por outro lado, o tratamento com GEM exerce um efeito que se caracteriza pela manutenção dos valores de TG reduzidos até o parto. Este efeito sustentado ao longo de toda gestação pode explicar parte das diferenças observadas na prole (mostradas adiante) sendo como consequência da ação “terapêutica” da GEM.

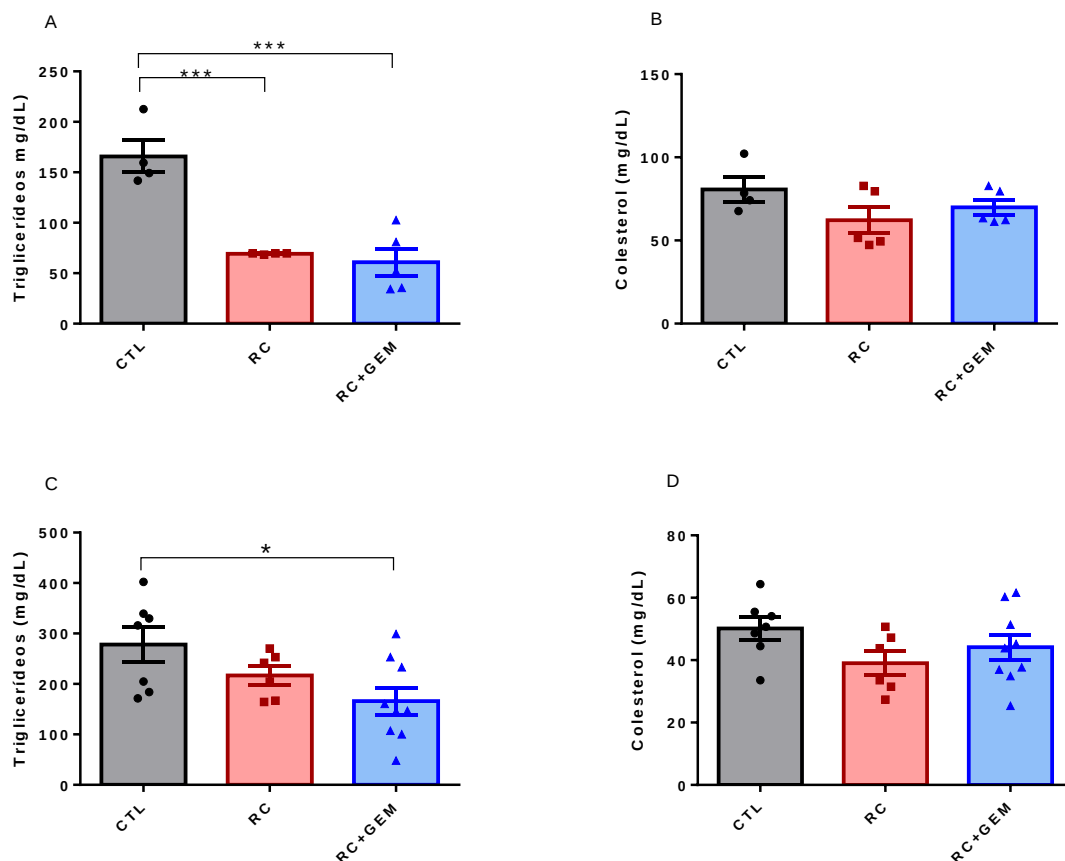


Figura 8 – Concentrações de TG e Colesterol em ratas gestantes no 15° (A, B) e no 20° (C, D) DG. Para TG, CTL (n= 4-7), RC (n= 4-6) e RC+GEM (n=5-9); para colesterol, CTL (n= 4-7), RC (n= 5-6) e RC+GEM (n= 5-9). Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: *p<0,05; ***p<0,001; ausência de * indica ausência de diferença estatística

4.1.3 Níveis hepáticos de TG

Os nossos resultados mostraram que a quantidade de gordura no fígado das mães RC e RC+GEM é similar à das CTL tanto no 15°, como no 20° DG (respectivamente **Fig. 9A** e **9B**). Nossa interpretação é de que a quantidade de gordura no fígado depende de múltiplas rotas bioquímicas, como a captação de ácidos graxos livres não esterificados (NEFA - *Non Esterified Fat Acids*) circulantes seguida de reesterificação, síntese de novo de ácidos graxos e captação de remanescentes de quilomícrons e lipoproteínas de densidade intermediária (IDL, do inglês *Intermediate-density lipoprotein*). Nem todas estas vias devem estar sendo moduladas pela RC e pela GEM, de modo que, apesar de variações em TG circulante, este parâmetro não se altera no fígado das mães.

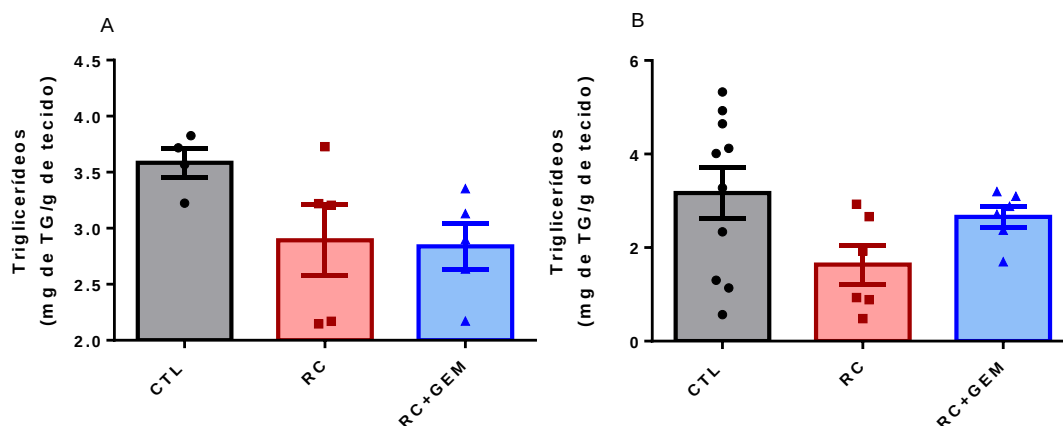


Figura 9 – Quantidade de TG em fígado de ratas gestantes no 15° **(A)** e no 20° **(B)** DG. No 15° DG, CTL (n= 4-10), RC (n= 5-6) e RC+GEM (n= 5-6). Valores expressos como média $\pm$ SEM.

4.1.4 Concentrações de corticosterona

As concentrações de corticosterona se mantiveram estatisticamente iguais quando comparamos os diferentes grupos no 20° DG ($p= 0,95$) (**Fig. 10B**). Deste modo, em nossas mãos, a RC de 50% não resultou em aumento da concentração de corticosterona conforme observado por Lesage e colaboradores (104). A explicação para isto pode decorrer do fato das concentrações de corticosterona serem particularmente sensíveis a uma série de variáveis ambientais, além daquelas pertencentes ao nosso modelo experimental (barulho, odores, ciclo de luz, temperatura e etc.). Por mais que controlemos todas estas variáveis, é impossível saber se as nossas condições de alojamento são idênticas às de outros biotérios. Ademais, é possível que, dada as particularidades de nosso biotério, uma eventual modulação das concentrações maternas de corticosterona ocorra em momentos mais precoces da gestação.

Assim, foi analisada as concentrações de corticosterona também no 15° DG. Observamos que as concentrações de corticosterona não foram moduladas pela RC isoladamente também neste momento da gestação. Entretanto, os níveis de corticosterona em mães RC+GEM apresentaram redução de 37,9% (vs. CTL; $p= 0,05$) e 35% (vs. RC; $p<0,05$) (**Fig. 10A**).

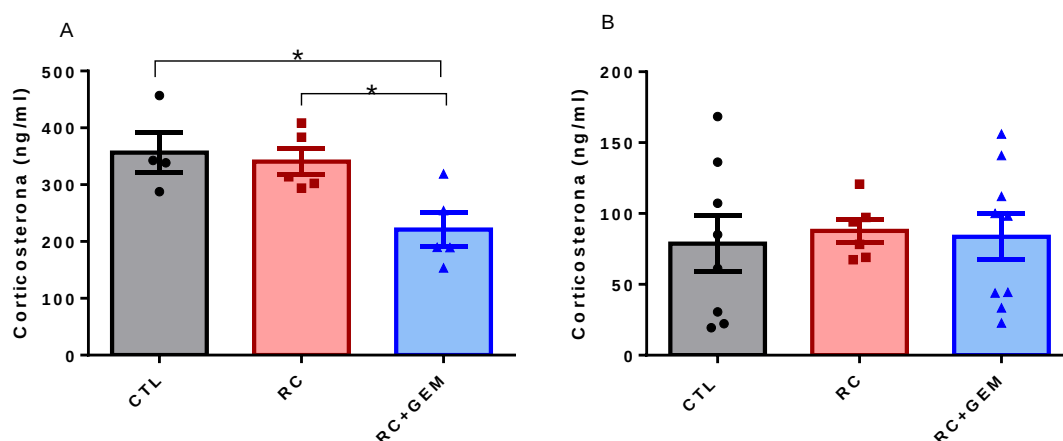


Figura 10 - Concentrações de corticosterona em de ratas prenhas no 15°(A) e no 20° DG (B). CTL (n= 4-8), RC (n= 5-7) e RC+GEM (n= 5-9). Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$; ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2 IMPACTOS NA PROLE DECORRENTES DA RESTRIÇÃO CALÓRICA COM OU SEM CONSUMO DE GEMFIBROZILA PELAS MÃES DURANTE GESTAÇÃO E LACTAÇÃO

4.2.1 Massa corporal das fêmeas das proles ao longo da vida

No 1° DL, os filhotes de mães RC e RC+GEM apresentaram massas corporais menores que os filhos de mães CTL (respectivamente 24,1% e 23,1% menores). A ninhada era composta por 4 filhotes do sexo feminino e 2 filhotes do sexo masculino e nesta etapa todos os filhotes foram pesados sem distinção de sexo.

Na 7ª semana de vida, as filhas de mães RC e RC+GEM apresentaram, respectivamente, massas corporais 36,8% e 32,4% menores que as de mães CTL ($p < 0,0001$). Na 12ª semana de vida, as filhas de mães RC e RC+GEM apresentaram, respectivamente, massas corporais 21,6% e 7,5% menores que as de mães CTL ($p < 0,0001$). Neste mesmo período as filhas de mães RC+GEM também apresentaram aumento de 7,5% na massa corporal quando comparada as filhas de mães RC ($p < 0,05$). Na 16ª semana de vida, as filhas de mães RC e RC+GEM apresentaram, respectivamente, massas corporais 21,9% e 14,7% menores que as de mães CTL ($p < 0,0001$). Além disso, as filhas de mães RC+GEM apresentaram massas corporais 9,1% maiores que as filhas

de mães RC ($p<0,01$). Na 20ª semana de vida, as filhas de mães RC e RC+GEM apresentaram, respectivamente, massas corporais 19,8% e 11,1% menores que as de mães CTL ($p<0,0001$ e $p<0,01$) e as filhas de mães RC+GEM também apresentaram massas corporais 10,8% maiores que as de mães RC ($p<0,05$). Por fim, na 24ª semana de vida, as filhas de mães RC e RC+GEM apresentaram, respectivamente, massas corporais 17,9% e 11,4% menores que as de mães CTL ($p<0,0001$ e $p<0,05$).

Deste modo, nossos dados mostraram que os animais que nasceram de mães que se submeteram à RC apresentaram BPN no 1ºDL independente de terem consumido ou não a GEM, porém com o passar das semanas de vida as filhas de mães que consumiram o fibrato durante a gestação e lactação, ganharam mais peso ao longo da vida que aquelas nascidas de mães que não consumiram.

É importante ressaltar que não foi observado efeitos teratogênicos no fenótipo da prole que nasceu de mães que foram tratadas com GEM. Tal observação corrobora com o estudo de Fitzgerald e colaboradores na qual foi constatado que o uso de GEM em doses de até 200mg/kg não foi capaz de causar teratogênia nas proles de ratas (74).

Na experiência clínica, a ativação de PPAR α com agonistas da classe dos fibratos parece ser neutra em relação ao ganho de peso corporal (105). Até o momento não há relatos sobre as características ponderais de uma prole exposta à RC associada ao fibrato na vida fetal.

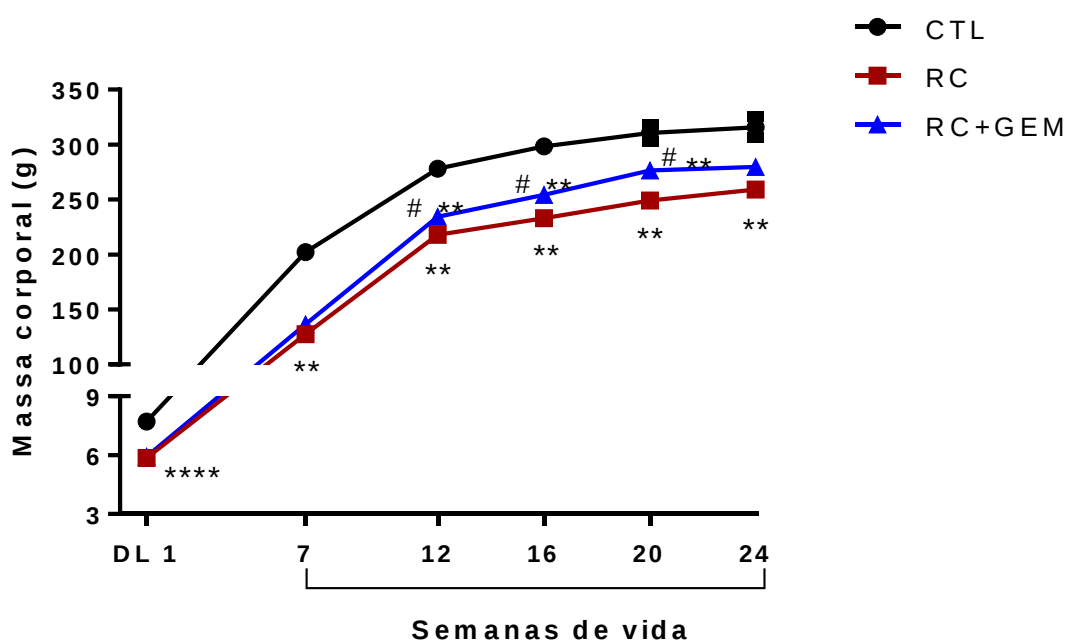


Figura 10 – Massa corporal das proles nascidas de mães CTL (n= 7-24), RC (n= 8-24) e RC+GEM (n= 5-30) na 7ª, 12ª, 16ª, 20ª e 24ª semanas de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. * $p<0,05$ vs. grupo CTL; # $p<0,05$ vs. grupo RC

4.2.2 Ingestão alimentar

A ingestão alimentar das ratas nascidas de mães RC e RC+GEM foi menor do que a de nascidas de mães CTL na 7ª semana de vida (redução de 14,7%; $p<0,0001$ e 10,43%; $p<0,01$, respectivamente) (**Fig. 11A**). Por outro lado, na 12ª e 16ª semanas de vida, houve um aumento do consumo de ração das filhas de mães RC+G quando comparado ao das filhas de mães CTL ($p<0,05$) (aumento de 23,1% na 12ª semana e 27,4% na 16ª semana) e também quando comparado ao consumo das filhas de RC (aumento de 33,8% na 12ª e 40,8% na 16ª semanas; $p<0,01$) (**Fig. 12B e Fig. 12C**). Já na 20ª semana de vida, apenas as ratas nascidas de mães RC apresentaram redução da ingestão alimentar (9,1% menor do que o consumo das nascidas de CTL; $p<0,05$) (**Fig. 12C**). Enquanto na 24ª semana de vida, não houve diferenças significativas no consumo de ração nos diferentes grupos.

Nossos dados sugerem que a maior ingestão alimentar das fêmeas nascidas de mães RC+GEM deve contribuir para uma recuperação da massa corporal mais intensa do que aquela observada em ratas nascidas de mães RC.

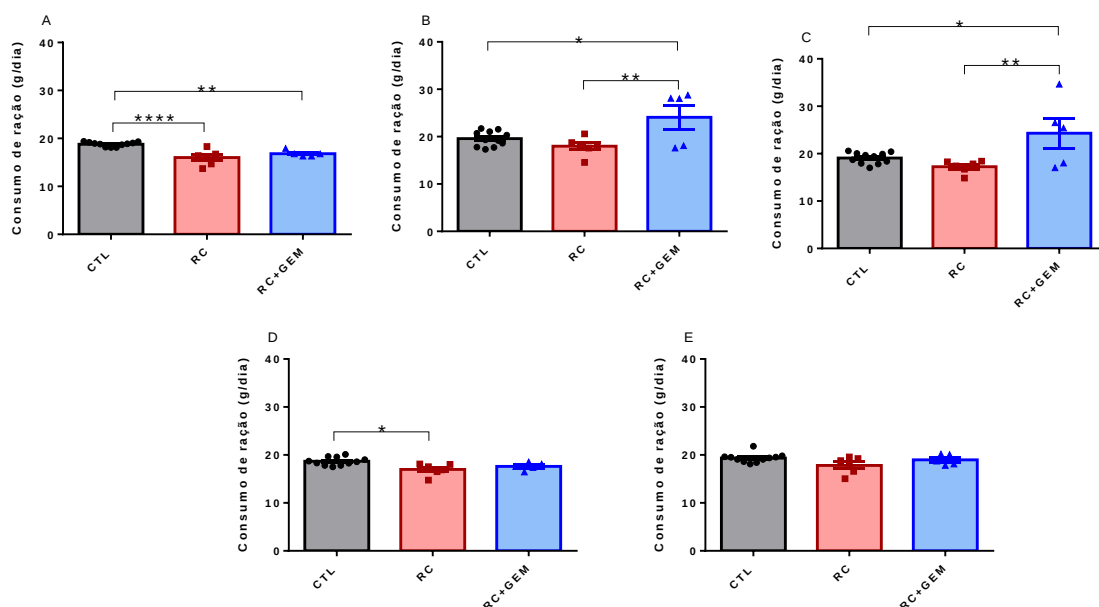


Figura 12 – Ingestão alimentar na 7ª (A), 12ª (B), 16ª (C), 20ª (D) e 24ª (E) semanas de vida de ratas nascidas de mães CTL (n=11), RC (n=6) e RC+GEM (n=5). Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p<0,05$; ** $p<0,01$; **** $p<0,0001$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2.3 Composição corporal por DEXA

As fêmeas nascidas de mães RC apresentaram maior porcentagem de massa magra ($p = 0,03$) e menor porcentagem de massa gorda ($p = 0,01$) quando comparadas às filhas de mães CTL entre as 20ª e 22ª semanas de vida. Mais importante, as filhas de mães RC+GEM apresentaram porcentagem de massa gorda similar a das filhas de mães CTL neste mesmo momento da vida (**Tabela 2**).

Até o momento, não encontramos na literatura descrição dos efeitos da adiposidade na prole nascida de mães expostas à GEM. No entanto, foi demonstrado que o tratamento com fibratos diminuiu o peso corporal e adiposidade em humanos e ratos obesos (106, 107). Estas informações indicam que ativação do PPAR α em diferentes momentos da vida (i.e.: vida adulta ou intrauterina e pós-natal) exerce impactos opostos sobre esta característica fenotípica.

Em nossos estudos, foi possível verificar que a ação da GEM, ao aumentar a adiposidade total, está revertendo os efeitos da RC materna, e que o conjunto de resultados até aqui apresentados mostraram que o tratamento de mães expostas à RC durante a gestação e lactação com GEM gerou uma prole que ingeriu mais ração, ganhou mais peso e mais adiposidade total.

	CTL	RC	RC+GEM
Massa magra (%)	80,49 $\pm$ 3,361	84,06 $\pm$ 2,275*	83,52 $\pm$ 2,144
Massa gorda (%)	16,18 $\pm$ 3,073	11,93 $\pm$ 2,331**	13,15 $\pm$ 2,163
Massa óssea (%)	3,882 $\pm$ 0,1307	4,020 $\pm$ 0,09069	3,917 $\pm$ 0,1611

Tabela 2 – Análise de adiposidade por tomografia computadorizada das fêmeas nascidas de mães CTL (n= 5), RC (n= 5) e RC+GEM (n= 4) entre a 20ª e 22ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. grupo controle.

4.2.4 Frações lipídicas no primeiro dia de vida

Não encontramos diferenças entre as concentrações de TG (**Fig. 13A**) e colesterol total (**Fig. 13B**) das filhas nascidas de mães CTL, RC e RC+GEM no primeiro dia de vida.

Até o momento, não foi encontrado na literatura os efeitos da exposição materna ao tratamento com GEM nas frações lipídicas da prole no 1ºDL.

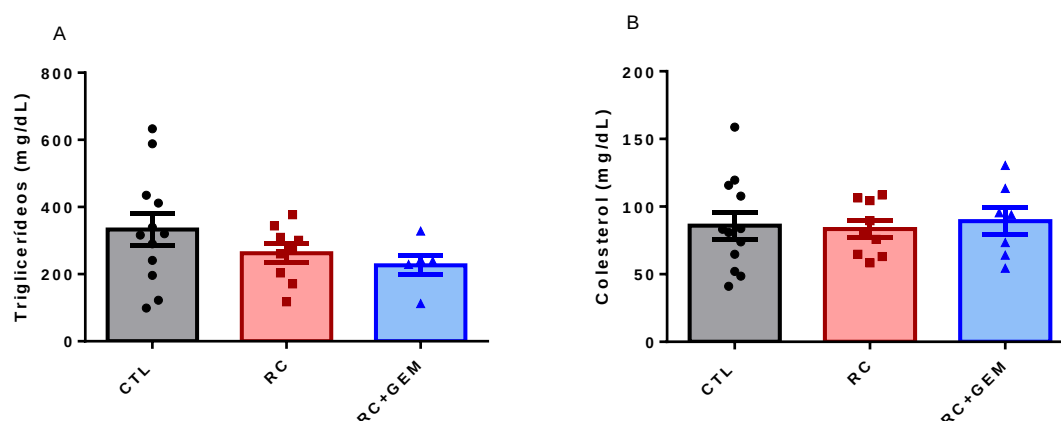


Figura 13 - Concentrações de TG (A) e colesterol (B) no soro dos neonatos nascidos de mães CTL (n=12), RC (n=9) e RC+GEM (n=6) no dia 1 de lactação. Valores expressos como média $\pm$ SEM.

4.2.5 Frações lipídicas na vida adulta

Ao atingirem a idade entre 24 e 27 semanas de vida, as proles nascidas de mães RC+GEM apresentaram redução de 27,6 % na concentração de TG de jejum quando comparadas às filhas nascidas de mães CTL ($p < 0,05$) (**Fig. 14A**). Redução similar também foi observada em estado alimentado (37,6% menor quando comparada às concentrações de TG das filhas de mães CTL; $p < 0,01$) (**Fig. 14B**). As concentrações de colesterol total das filhas de mães RC+GEM estavam aumentadas em 27,1%, quando comparadas às das filhas CTL ($p < 0,0001$), e em 35,2% quando comparada às das filhas de mães RC ($p < 0,0001$) (**Fig. 14C**).

Como já descrito, a administração de GEM em pessoas normolipidêmicas diminui as concentrações de TG, reduz colesterol total e aumenta colesterol HDL (108). Os mecanismos pelos quais os fibratos promovem redução de TG já são bem esclarecidos e se baseiam principalmente em uma ação hepática que potencializa a beta-oxidação de ácidos graxos e reduz a expressão de ApoCIII, uma apolipoproteína presente majoritariamente em quilomícrons e VLDL, que exerce ação inibitória sobre a LPL (109).

É importante salientar que a programação metabólica exercida pela GEM pode decorrer de uma ação direta na prole durante a vida pós-natal. A ação direta da GEM neste momento da vida pode ser possível via eliminação da droga pelo leite materno. Apesar de não ter sido descrito que a GEM possa ser excretada através do leite materno, este fenômeno já foi observado em outras drogas da mesma classe, tal como o ciprofibrato (110).

Nossos dados mostram, portanto, que a ação intrauterina e pós-natal da GEM gera alterações fenotípicas similares às esperadas da ação desta droga na vida adulta.

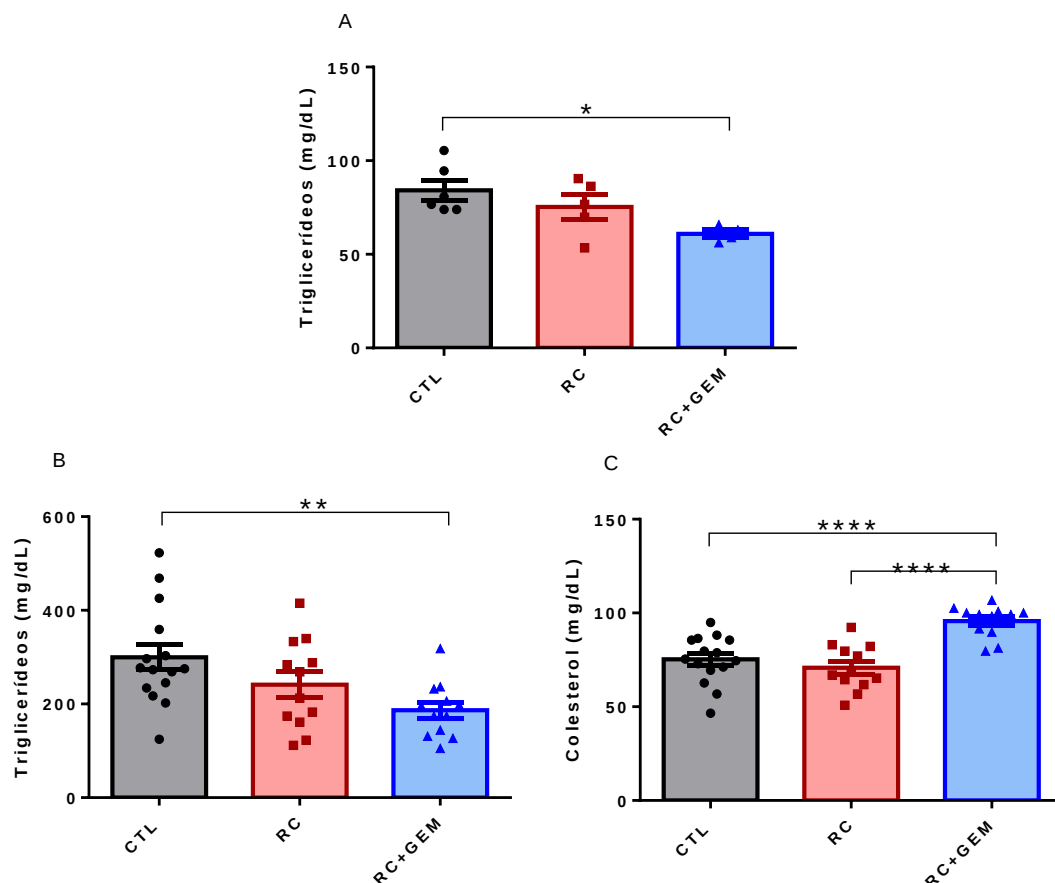


Figura 14 – Concentração de TG no soro de ratas em jejum nascidas de mães CTL (n= 7), RC (n= 5) e RC+GEM (n= 4) com 24 semanas de vida (A). Concentração de TG (B) e colesterol (C) no soro de ratas em estado alimentado nascidas de mães CTL (n= 15), RC (n= 12) e RC+GEM (n= 12-13) com 27 semanas de vida. Valores expressos como média ± SEM. as diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: *p<0,05; **p<0,01; ****p<0,0001. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2.6 Níveis hepáticos de TG

A quantidade de TG no fígado de fêmeas nascidas de mães RC+GEM foi 30,54% menor do que a observada em fêmeas nascidas de mães CTL quando estas atingiram 26 semanas de vida ($p<0,01$). Tal modulação não foi encontrada na prole de mães RC (Fig. 15).

Em concordância com nossos dados, o uso de agonista seletivo de $PPAR\alpha$ em camundongos obesos foi capaz de diminuir os níveis plasmáticos e hepáticos de TG

(111). Deste modo, a programação hepática do metabolismo lipídico pela GEM gera efeitos similares ao efeito direto da droga na vida adulta.

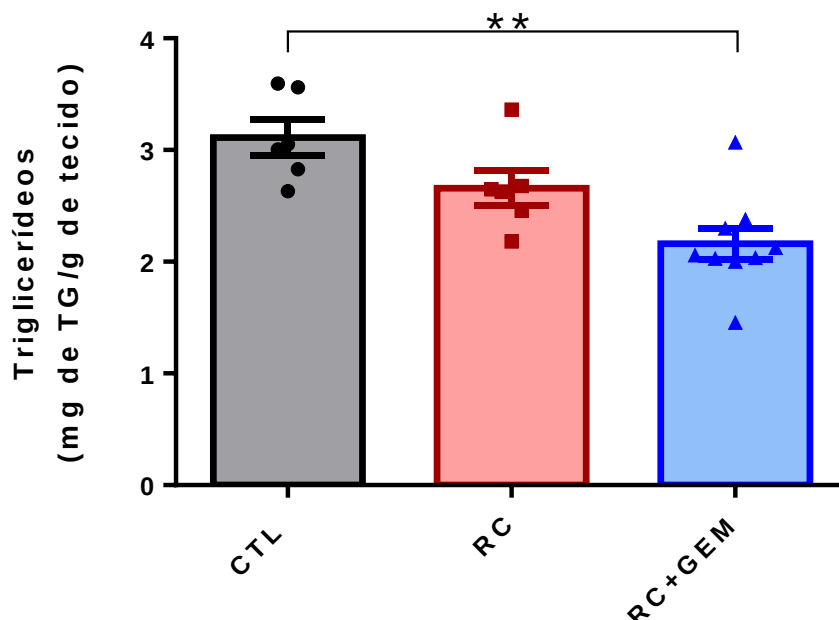


Figura 15 – Quantidade de TG no fígado de ratas nascidas de mães CTL (n=6), RC (n=6) e RC+GEM (n=9) com 26 semanas de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: ** $p < 0,001$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2.7 Produção de VLDL

As fêmeas nascidas de mães RC e RC+GEM apresentaram redução na produção de VLDL quando atingiram a 12ª semana de vida. Esta conclusão se baseou no fato de que as concentrações de TG em ratas nascidas de mães RC e RC+GEM são, respectivamente, 29,1% e 38,7% menores do que as de ratas nascidas de mães CTL 6 horas após a injeção de tyloxapol ($p < 0,05$ e $p < 0,01$) (**Fig. 16A**). Ao atingirem 24 semanas de vida, entretanto, apenas as filhas de mães RC+GEM apresentaram menores concentrações de TG após injeção de tyloxapol (40,6% menores do que as ratas nascidas de CTL; $p = 0,008$) (**Fig. 16B**).

É relevante apontar que a prole de RC+GEM apresentou redução da produção hepática de VLDL, menor conteúdo de TG no fígado e no soro. Os mecanismos hipotrigliceridêmicos dos agonistas de $PPAR\alpha$ decorrem dos efeitos combinados de estímulo da expressão de LPL e repressão da ApoCIII (112).

A LPL é uma enzima muito importante no metabolismo energético, tendo como função hidrolisar moléculas de TG encontradas em lipoproteínas com o intuito de liberar os ácidos graxos (113). Já a ApoCIII é uma coenzima produzida no fígado e está associada com a inibição da atividade da LPL (113). Os agonistas de PPAR α induzem a captação de ácidos graxos hepáticos e reduz a produção de TG no fígado por meio da β -oxidação, além de aumentar a conversão dos ácidos graxos em acetil-CoA e diminuir a síntese de VLDL (114, 115).

Deste modo, nossos dados suportam um achado ainda sem precedentes que o efeito terapêutico da GEM, um ativador de PPAR α redutor de TG, pode ser transmitido para gerações.

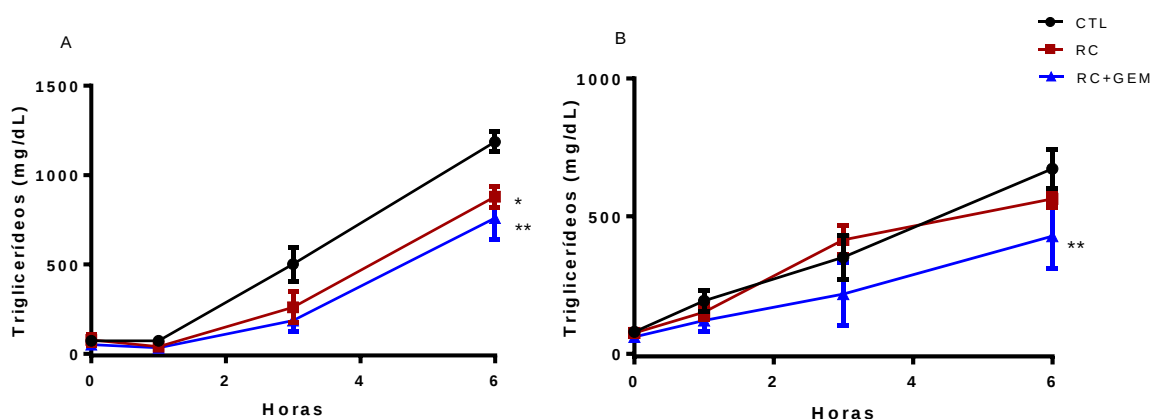


Figura 16 – Concentrações de TG após aplicação de Tyloxapol na 12° (A) e na 24° (B) semanas de vida de fêmeas nascidas de mães CTL (n= 6-7), RC (n= 4-6) e RC+GEM (n= 4-6). Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ vs. grupo CTL. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2.8 Gasto energético e quociente respiratório

Não encontramos diferenças entre os valores de gasto energético das ratas nascidas de mães CTL, RC e RC+GEM entre as 22 e 26 semanas de vida (Fig. 17A). Os valores de quociente respiratório também foram similares entre os diferentes grupos (Fig. 17B).

É relevante destacar aqui que as ratas nascidas dos três diferentes grupos de mães apresentaram, nesta idade, flexibilidade metabólica. Isto pode ser concluído, pois em ambos grupos o gasto energético na fase escura é maior do que aquele na fase clara e também o RQ noturno é maior que o encontrado na fase clara. Também podemos supor que a redução do conteúdo de TG hepático observado na prole RC+GEM não deve

decorrer de um maior gasto energético e tão pouco de uma preferência por ácidos graxos como substrato oxidativo.

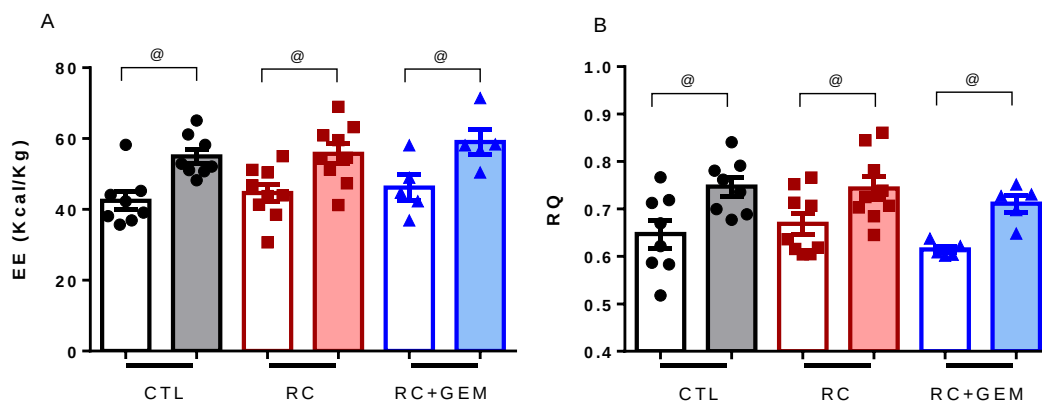


Figura 17 – Gasto energético e quociente respiratório em ratas nascidas de mães CTL (n= 8), RC (n= 9) e RC+GEM (n= 5) entre a 22ª e 26ª semanas de vida. Colunas no gráfico que não estão preenchidas demonstram a Fase Clara, já as colunas com preenchimento demonstram a Fase Escura. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: @p<0,05. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2.9 Tolerância à glicose

Ao atingirem 24 semanas de vida, as ratas nascidas de mães RC e RC+GEM apresentaram tolerância à glicose semelhante às filhas nascidas de mães CTL. Esta conclusão é baseada nas concentrações de glicose em função do tempo e nas áreas sob as curvas do GTT. Porém, quando comparamos as ratas nascidas de mães RC+GEM às filhas de mães RC observamos uma redução de 28% na área sob a curva (AUC). (**Fig. 18**).

Nossos dados demonstraram que as fêmeas das proles nascidas de mães expostas à RC durante gestação e lactação não apresentam intolerância à glicose na vida adulta. Estes achados são similares àqueles já publicados por Escrivá e colaboradores, em que se observou que ratos nascidos e amamentados por mães expostas à RC não apresentavam diferenças na tolerância à glicose quando comparados aos animais nascidos de mães que consumiram ração *ad libitum* (116). Resultados parecidos foram encontrados em ratas fêmeas adultas com 2 e 15 meses de vida nascidas e amamentadas por mães expostas à RC de 50% durante gestação e lactação (117).

É interessante contextualizar que a aceleração do ganho de peso em uma prole de ratos com IUGR por meio de uma exposição pós-natal a uma dieta hipercalórica, leva ao aumento de adiposidade e desenvolvimento de intolerância à glicose na vida adulta (118).

Deste modo, podemos concluir que o *catch up* parcial de peso e adiposidade decorrentes do tratamento precoce de uma prole IUGR com GEM apresenta características singulares e positivas, na medida em que estas alterações ponderais não são acompanhadas de redução na tolerância à glicose. Igualmente, se levada em consideração a tolerância a glicose da prole que permaneceu com baixo peso na vida adulta (RC), a exposição precoce a GEM imprimiu um aumento da tolerância à glicose.

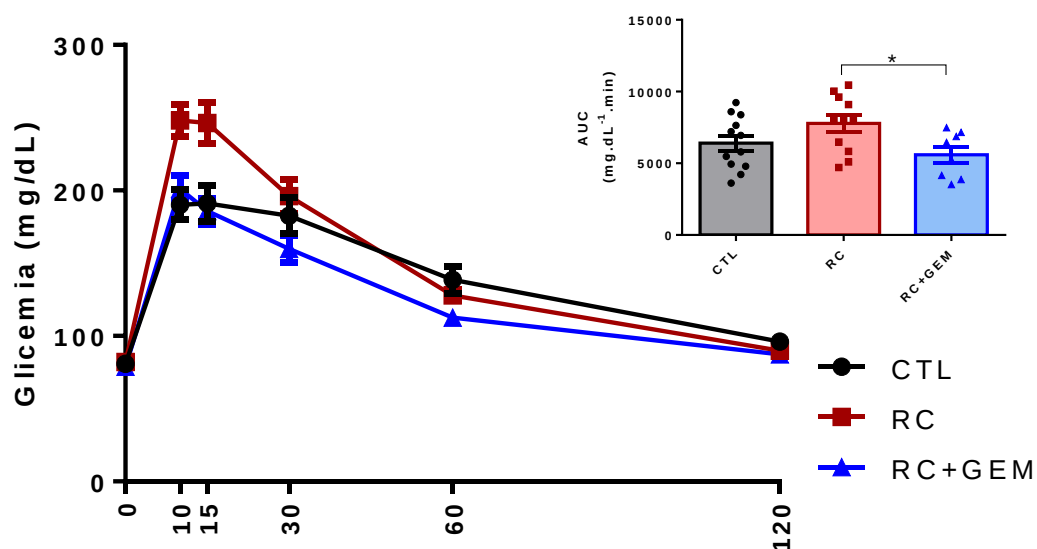


Figura 18 – Tolerância à glicose nas ratas nascidas de mães CTL (n= 12), RC (n= 11) e RC+GEM (n= 8) 24ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2.10 Sensibilidade à insulina

Na 25ª semana de vida foi observado que as filhas de mães RC apresentaram um aumento na sensibilidade à insulina quando comparada as filhas de mães CTL (aumento de 50,4%; $p < 0,05$) e as filhas de mães RC+GEM (aumento de 106,1%; $p < 0,01$). Tal conclusão se sustenta com base nas comparações dos valores de K_{ITT} (**Fig. 19**). As filhas de mães RC+GEM, entretanto, apresentam sensibilidade à insulina semelhante às filhas de mães CTL.

A partir dos resultados apresentados do GTT e ITT, podemos notar que nossos dados corroboram com a literatura, pois, como já mencionado, a RC durante a gestação e período pós-natal resulta em uma adiposidade permanentemente reduzida durante toda a vida, ausência de intolerância à glicose e melhora na resistência à insulina (119). Estas alterações são distintas daquelas observadas no metabolismo adulto de proles nascidas com IUGR e amamentadas por mães alimentadas *ad libitum* (39).

Camundongos PPAR α *knockout* apresentaram redução da oxidação de ácidos graxos e aumento da secreção de insulina induzida por glicose (120). Dessa maneira o aumento da tolerância à glicose da prole RC+GEM deve ser mais uma consequência do aumento da secreção de insulina do que o aumento da captação de glicose por tecidos insulino-responsivos.

A exposição materna ao tratamento com GEM também foi capaz de aumentar a tolerância à glicose na prole (quando comparada ao grupo RC) sem causar resistência à insulina. Entretanto, o aumento da sensibilidade à insulina observado em decorrência da RC materna isolada, é suprimido na prole RC+GEM.

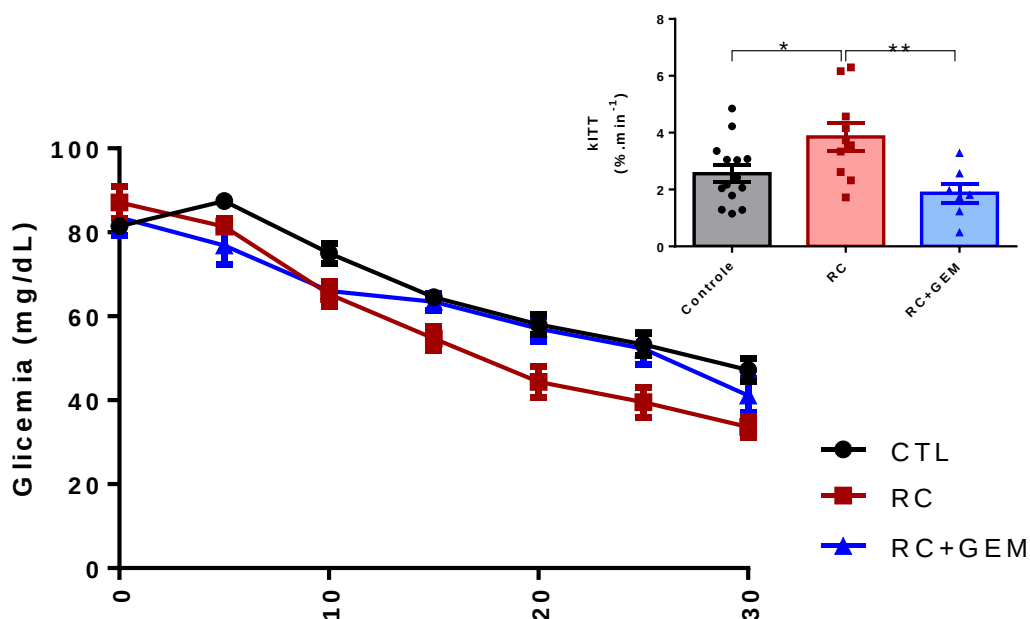


Figura 19 – Sensibilidade à insulina nas ratas nascidas de mães CTL (n= 14), RC (n= 10) e RC+GEM (n=7) na 25ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: *p<0,05; **p<0,01. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.2.11 Peso relativo dos diferentes coxins de tecido adiposo e músculo

As filhas de mães RC e RC+GEM apresentaram menor adiposidade do coxim perigonadal (53% e 48,6%; $p < 0,01$, respectivamente) quando comparadas às filhas nascidas de mães CTL (**Fig. 20A**). De maneira semelhante, as filhas de mães RC e RC+GEM apresentaram menor adiposidade do coxim retroperitoneal (48,3% e 42%; $p < 0,0001$ e $p < 0,01$, respectivamente) quando comparadas às filhas nascidas de mães CTL (**Fig. 20B**). Entretanto, o peso relativo do BAT foi igual entre os diferentes grupos (**Fig. 20C**).

Uma análise mais ampla dos resultados em diferentes medidas de adiposidade (DEXA e peso relativo dos coxins) sugeriu que o ganho de adiposidade adicional que as fêmeas nascidas de mães RC+GEM apresentaram em relação às ratas nascidas de RC pode ter sido consequência do acúmulo de massa adiposa em outros coxins, como subcutâneo, omental ou mesentérico. Chegamos a esta conclusão, pois no mesmo momento em que as proles de RC+GEM apresentaram aumento de adiposidade geral, obtida por DEXA, tais proles não apresentaram aumento do peso relativo dos coxins perigonadal e retroperitoneal.

Até o momento, não há na literatura descrição dos efeitos do tratamento materno com GEM, e nem de outros agonistas de PPAR α , na adiposidade das proles. Porém, ao explorar as diferenças entre os coxins viscerais e subcutâneo, nota-se que os adipócitos dos coxins viscerais apresentam maior taxa relativa de lipólise (121), sugerindo que tais territórios anatômicos possam ser mais susceptíveis a redução de VLDL causada pela GEM. É válido ressaltar que em nosso trabalho pesamos apenas os coxins perigonadal e retroperitoneal, porém há outros coxins adiposos viscerais (omental e mesentérico), além do subcutâneo, na qual podem ser menos susceptível a ação da GEM.

Também é observado que as mulheres apresentam teor total de adiposidade superior aos dos homens com acúmulo maior no coxim subcutâneo (122).

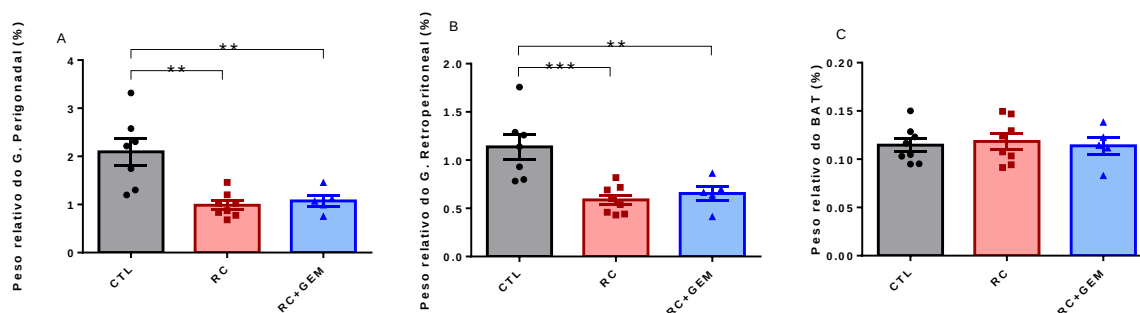


Figura 20 – Peso relativo da gorduras perigonadal (A), retroperitoneal (B) e do BAT (C) das filhas de mães CTL (n= 7), RC (n= 8) e RC+GEM (n= 5) na 26ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

Em conjunto, nossos dados e a literatura mostraram que o ganho de peso acelerado em uma prole que nasce com baixo peso predispõe à intolerância à glicose na vida adulta. Tal programação fenotípica pode ser evitada caso a recuperação integral de peso seja prevenida.

Deste modo, tem se revelado desafiador desenvolver uma estratégia que ao mesmo tempo recupere o peso e a adiposidade de uma prole com IUGR e não predisponha à intolerância à glicose e/ou resistência à insulina na vida adulta. Neste sentido, nossos desfechos decorrentes do uso materno de GEM se revelaram promissores. Esta afirmação se deve ao fato de que o uso de GEM por mães expostas à RC durante gestação e lactação consegue recuperar o peso ou adiposidade da prole na vida adulta sem impor a ela intolerância à glicose e resistência à insulina.

Nossos dados indicaram que o uso de GEM por mães expostas à RC na gestação e lactação proporcionou às proles um ganho de peso e adiposidade muito particular. As proles nascidas de mães RC+GEM apresentaram aumento de adiposidade (revelado por DEXA) e peso corporal sem aumentar o peso relativo dos coxins que contribuem para adiposidade visceral. Isto indica que o uso de GEM por mães expostas à RC pode ter aumentado a adiposidade em outros coxins da prole.

É digno de nota que a distribuição do tecido adiposo é um dos principais determinantes da mortalidade e morbidade na obesidade (123). Especificamente, o acúmulo de tecido adiposo intra-abdominal ou visceral está associado a DM2, dislipidemia e hipertensão (124). Esta relação foi originalmente atribuída ao aumento do fluxo de NEFA do tecido adiposo visceral para a circulação portal (125). No entanto, o tecido adiposo visceral faz apenas uma contribuição menor para as concentrações do

portal NEFA sugerindo que outros fatores, como as adipocinas, também estejam envolvidas (126, 127).

Independentemente da massa relativa de tecido adiposo visceral, outros estudos descreveram que maiores quantidades de tecido adiposo subcutâneo, particularmente na parte inferior do corpo, podem proteger contra intolerância à glicose, resistência à insulina, dislipidemia e aterosclerose (128). O tecido adiposo glúteo-femoral, por exemplo, é refratário às alterações deletérias na expressão gênica que marcam a obesidade (129). Estes dados da literatura são, de certo modo, corroborados por nossos experimentos, pois a prole de mães RC+GEM não apresentou intolerância à glicose.

Outro parâmetro relevante é de que a prole de RC+GEM apresentou redução da produção hepática de VLDL e menor conteúdo de TG no fígado. Estes dados sem precedentes na literatura mostraram que o efeito terapêutico da GEM, um ativador de PPAR α redutor de TG, pode ser transmitido para gerações. Lillycrop e colaboradores demonstraram que a prole nascida de ratas expostas à RC durante o período gestacional apresentaram hipometilação em ilhas CpG específicas da região hepática promotora de PPAR α (35).

Com isso, é intrigante imaginar o mecanismo epigenético que a ativação materna do PPAR α recruta para modular o fenótipo na geração seguinte.

4.3 EFEITOS DA RESTRIÇÃO CALÓRICA E DO CONSUMO DE PIOGLITAZONA NOS PARÂMETROS MATERNOS

4.3.1 Massa corporal

No primeiro dia de tratamento, equivalente ao 11º DG, não houve diferenças específicas entre as massas corporais das mães alocadas nos grupos CTL, RC, PIO e RC+PIO. Entretanto, foi observada uma influência do fator RC, mas não do fator PIO.

Como mostrado na **Figura 21**, a massa corporal das mães expostas RC (RC e RC+PIO) estavam 22,7% menor do que a de mães que não foram expostas à RC (CTL e PIO) ($p < 0,0001$) no 1º DL. Este efeito da alimentação sobre o peso materno se manteve no 10º DL (mães expostas à RC foram 28,9% menores do que mães sem RC; $p < 0,0001$) e no 21º DL (mães expostas à RC foram 29,7% menores do que mães sem RC; $p < 0,0001$).

A PIO, combinada ou não à RC, não interferiu de maneira específica no peso materno em nenhum momento da observação.

Já é sabido que as TZD têm como efeito colateral aumentar o ganho de peso através da adipogênese, porém um trabalho de Asnani e colaboradores demonstrou que pacientes tratados com PIO apresentam capacidade de perder peso através de uma dieta restrita em calorias (130). Tal estudo corrobora com os resultados encontrados em nossa pesquisa, no qual as ratas que foram expostas à RC e tratadas com PIO não ganharam peso.

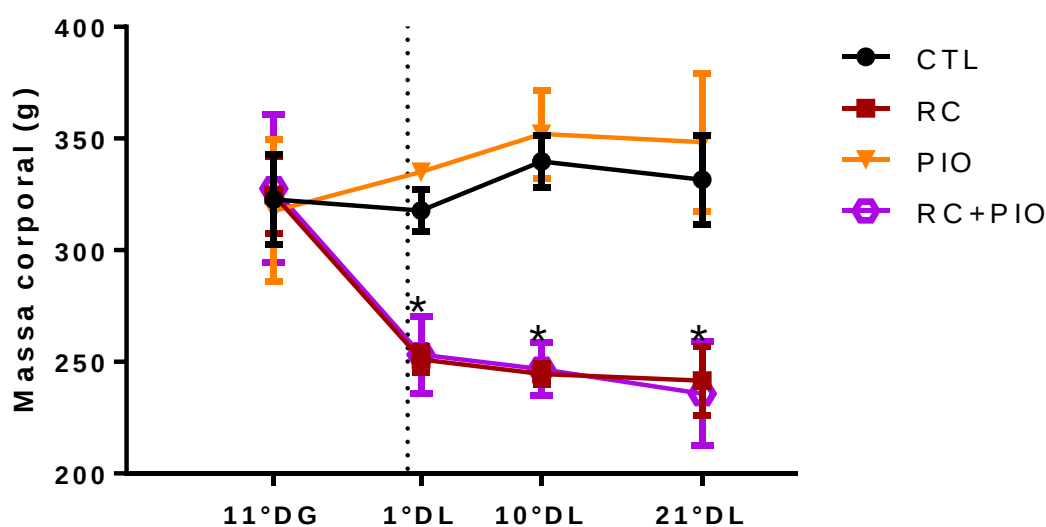


Figura 21 – Massa corporal (g) das mães CTL (n= 15), RC (n= 15), PIO (n= 11) e RC+PIO (n= 18) no 11º DG, 1º DL, 10º DL e 21º DL. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$ vs animais sem RC (CTL e PIO). Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

Dessa maneira, nos nossos resultados de peso corporal das mães e da prole que mostraremos adiante, a PIO não foi capaz de alterar o peso pela associação a dieta que foi imposta as mães.

4.4 IMPACTOS NA PROLE DECORRENTES DA RESTRIÇÃO CALÓRICA COM OU SEM CONSUMO DE PIOGLITAZONA DURANTE GESTAÇÃO

4.4.1 Massa corporal ao longo da vida

Ambos fatores (tratamento materno com PIO e RC materna) apresentaram interação significativa na prole desde o nascimento (DL 1) até a 12ª semana de vida (DL 1 $p < 0,0001$; 7ª semana $p < 0,0001$; 12ª semana $p < 0,01$). Os fatores de exposição materna à RC e tratamento materno com PIO interferiram no peso da prole com 1 dia de vida e também foi observado o mesmo efeito na 7ª e 12ª semanas de vida ($p < 0,0001$ para DL 1 e na 7ª semana e $p < 0,05$ na 12ª semana). As ratas nascidas de mães expostas ao fator RC (RC e RC+PIO) apresentaram menor massa corporal em relação às nascidas de mães sem RC (CTL e PIO), respectivamente 24,1%, 29,8% e 16,6% menores ($p < 0,0001$). Na análise grupo a grupo foi observado que as ratas nascidas de mães PIO também apresentaram menor peso corporal quando comparadas às filhas de mães CTL (17,5% no DL1, 9,3% menores na 7ª e 4,1% menores na 12ª semanas de vida, respectivamente $p < 0,0001$ para DL1 e 7ª semana e $p < 0,05$ na 12ª semana de vida).

Na 16ª semana de vida, a massa corporal da prole sofreu influência do fator de exposição materna à RC ($p < 0,0001$) e interação dos fatores ($p = 0,0002$). As ratas nascidas de mães expostas ao fator RC (RC e RC+PIO) apresentaram redução de 16,5% ($p < 0,0001$) na massa corporal em relação às filhas de mães que não foram expostas à RC (CTL e PIO). Na análise grupo a grupo foi observado que as ratas nascidas de mães PIO também apresentaram menor peso de massa corporal quando comparadas as filhas nascidas de mães CTL (8,5%; $p < 0,01$).

Na 20ª e 24ª semanas de vida, a massa corporal da prole sofreu influência apenas do fator de exposição materna ao tratamento com PIO. As ratas nascidas de mães expostas ao fator RC apresentaram menor massa corporal em relação às nascidas de mães que não foram expostas à RC (respectivamente 15,5%; $p < 0,0001$ na 20ª semana e 14,1%; $p < 0,0001$ na 24ª semana).

Apesar do efeito transitório decorrente da exposição à PIO no começo da vida, a combinação entre os dois fatores não foi suficiente para promover diminuição adicional no peso da prole, de tal modo que as ratas nascidas de mães expostas à RC e ao tratamento com PIO apresentaram redução de peso similar àquelas nascidas de mães expostas somente à RC.

Nossos dados corroboram com os achados na literatura, pois já foi demonstrado que o uso de agonistas de PPAR γ nos períodos pré e pós natal reduziram o peso fetal e o crescimento da prole (89, 131). Além disso é importante ressaltarmos que a administração de PIO nas mães durante a gestação, não foi capaz de causar teratogenia no fenótipo da prole.

Dessa maneira, foi observado que a PIO administrada nas mães expostas à RC durante a gestação e a lactação não foi capaz de aumentar o peso da prole ao longo da vida, tendo assim um predomínio da ação da RC.

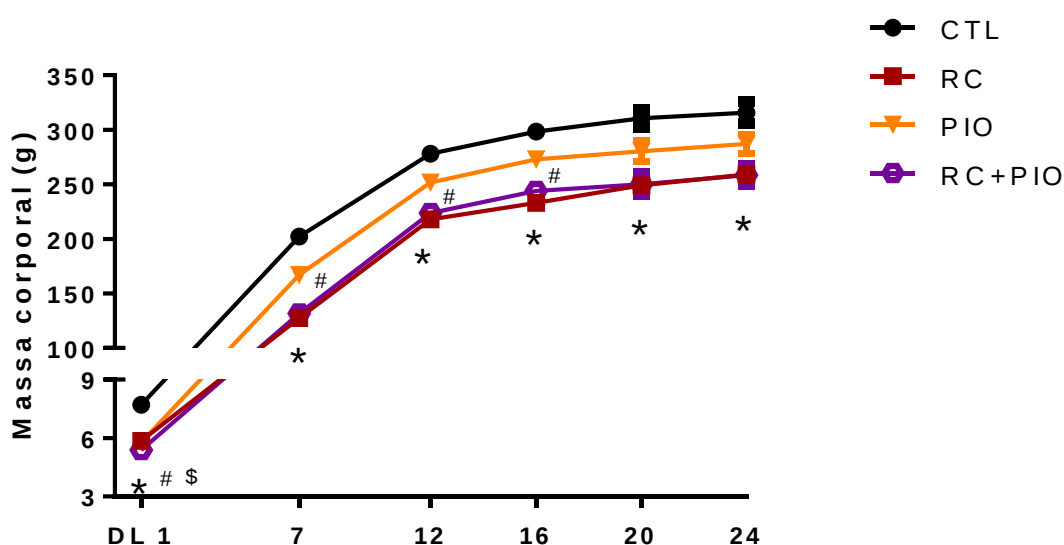


Figura 21 – Massa das proles nascidas de mães CTL (n= 8-15), RC (n= 8-15), PIO (n= 5-11) e RC+PIO (n= 8-18) na 7^a, 12^a, 16^a, 20^a e 24^a semanas de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: *p<0,05 vs CTL e PIO; # p<0,05 PIO $\neq$ CTL; \$ p<0,05 quando RC $\neq$ RC+PIO. Ausência de *, # e \$ indica ausência de diferença estatística.

4.4.2 Ingestão alimentar

A ingestão materna na 7^a semana de vida da prole sofreu influências dos fatores de exposição materna à RC e ao tratamento com PIO. Houve redução de 14,7% na ingestão alimentar de ratas nascidas de mães que foram expostas à RC quando comparadas com as filhas de mães que não foram expostas à RC (p=0,0014). Além disso, houve uma redução de 14,7% na ingestão alimentar das filhas de mães que foram tratadas com PIO quando comparadas as filhas de mães que não foram tratadas com PIO (p<0,0001). Na análise grupo a grupo, foi observado uma redução na ingestão alimentar

das filhas de mães PIO, RC e RC+PIO quando comparadas às filhas de mães CTL (respectivamente 18,5%, 14,7% e 23,4%) (**Fig. 23A**).

A ingestão alimentar, na 12ª semana de vida, sofreu influência do fator exposição materna à RC ($p<0,0001$) e interação significativa entre os fatores ($p<0,01$). Houve redução de 8% na ingestão alimentar das ratas nascidas de mães que foram expostas ao fator RC quando comparadas com as filhas de mães que não foram expostas à RC. Na análise grupo a grupo, foi observado aumento na ingestão alimentar das filhas de mães PIO quando comparada às filhas de mãe CTL, RC e RC+PIO (respectivamente 22,8%; $p<0,001$, 33,6%; $p<0,001$ e 44,4%; $p<0,0001$).

A ingestão alimentar sofreu influência dos fatores exposição materna à RC ($p<0,01$) e a PIO ($p<0,0001$) com interação significativa ($p<0,05$), na 16ª semana de vida. Na análise grupo a grupo, foi observado aumento na ingestão alimentar das filhas de mães PIO quando comparada às filhas de mãe CTL, RC e RC+PIO (respectivamente 23,4%; $p<0,001$, 36,4%; $p<0,0001$ e 42,8%; $p<0,0001$) (**Figs. 23B e 23C**).

Sobre a ingestão alimentar na 20ª semana de vida foi observada influência do fator exposição materna à RC. Houve uma redução de 9,1% na ingestão alimentar de ratas nascidas de mães que foram expostas à RC quando comparadas com as filhas de mães que não foram expostas à RC ($p=0,002$). Na análise grupo a grupo, foi observado uma redução de 14,5% na ingestão alimentar das filhas de mães RC+PIO quando comparada as das filhas de mães CTL (**Fig. 23D**).

Na ingestão alimentar na 24ª semana de vida, foram observadas influências dos fatores de exposição materna à RC e ao tratamento com PIO. Houve uma redução de 7,9% na ingestão alimentar de ratas nascidas de mães que foram expostas à RC quando comparadas com as filhas de mães que não foram expostas à RC ($p=0,001$). Além disso, houve uma redução de 6,5% na ingestão alimentar das filhas de mães que foram tratadas com PIO quando comparadas as filhas de mães que não foram tratadas com PIO ($p=0,012$). Na análise grupo a grupo, foi observado uma redução de 7,9% na ingestão alimentar das filhas de mães RCP quando comparada as filhas de mães CTL e de 9,3% quando comparada as filhas de mães PIO (**Figs. 23E**).

Já foi constatado que a administração de PIO aumenta o consumo de alimentos em roedores (132) e que a RC durante o período de lactação faz com que a prole ganhe menos peso e consuma menos calorias (133). Dessa maneira, podemos observar que o aumento do consumo alimentar das filhas de mães PIO em tais semanas coincide com aumento da massa corporal das mesmas. Ao analisarmos as filhas de mães RC+PIO,

observamos que não houve tal aumento na ingestão, deixando claro que, o efeito da exposição materna à RC sobrepõe-se ao do tratamento com PIO, no que diz respeito à modulação da ingestão alimentar.

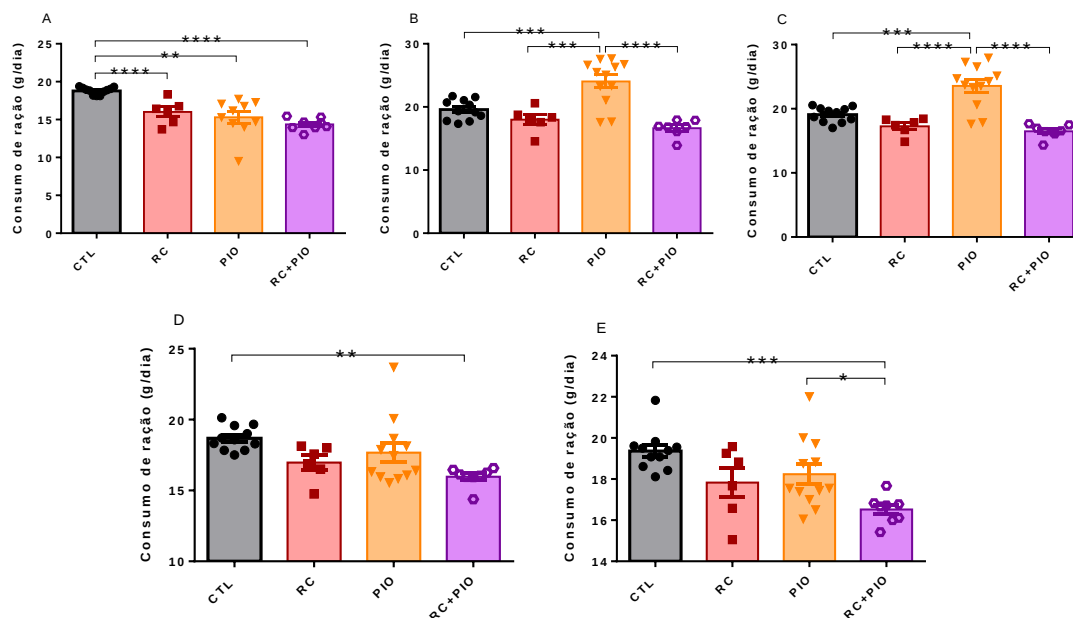


Figura 23 – Ingestão alimentar de ratas nascidas de mães CTL (n= 11), RC (n= 6), PIO (n= 10-12) e RC+PIO (n= 8) na 7^a (A), 12^a (B), 16^a (C), 20^a (D) e 24^a (E) semanas de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001 e ****p<0,0001. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.3 Gasto energético e quociente respiratório

Todos os grupos apresentaram um gasto energético maior na fase escura do que na fase clara (em média 28% maiores; p<0,05). Apesar disto, o fator de exposição materna à PIO foi capaz de diminuir o gasto energético. No caso, as filhas nascidas de mães expostas a PIO, independente da fase, apresentaram um gasto energético menor do que àquelas nascidas de mães não expostas a PIO (27,7% menor na fase clara e 24% menor na fase escura; p<0,0001). O fator RC não interferiu no EE da prole (**Fig. 24A**).

As filhas nascidas de mães não expostas à PIO apresentaram RQ na fase clara maior que na fase escura (p<0,05). Tal fenômeno não foi observado nas filhas nascidas de mães expostas a PIO (**Fig. 24 B**). Deste modo, nossos dados permitem a conclusão de que as filhas de mães que receberam PIO, independente da exposição ou não à RC, apresentaram inflexibilidade metabólica.

De acordo com Lu e colaboradores, a expressão de PPAR γ , no sistema nervoso, desempenha papel importante na regulação do metabolismo energético (134). Estes

autores descreveram que camundongos *knockout* para PPAR γ neuronal apresentaram menor ingestão alimentar e aumento do gasto energético, o que pode ser explicado pelo aumento da sensibilidade central a leptina e a expressão do gene UCP1 nos tecidos adiposos branco e marrom (134). Além do mais, já foi demonstrado que o PPAR γ aumenta a ingestão alimentar através da supressão da grelina em roedores (132). Dessa maneira ao analisar os resultados presentes podemos concluir que a prole nascida de mães que foram expostas à RC e tratadas com PIO apresenta diminuição do gasto energético sem aumento da ingestão alimentar.

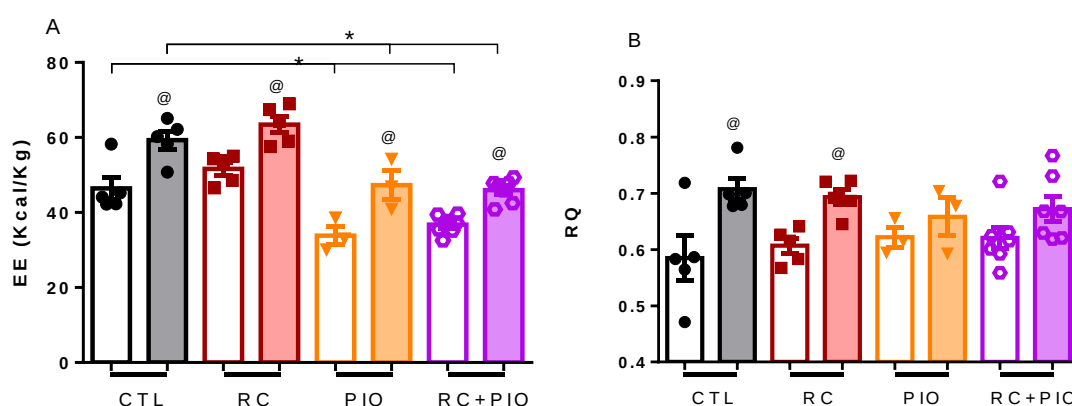


Figura 24 – Gasto energético e quociente respiratório em termoneutralidade da 22ª a 26ª semanas de vida das ratas nascidas de mães CTL (n= 5), RC (n= 5), PIO (n= 3) e RC+PIO (n= 7). Colunas no gráfico que não estão preenchidas demonstram a Fase Clara, já as colunas com preenchimento demonstram a Fase Escura. Valores foram expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: @p<0,05; * p<0,05. Ausência de @ ou * indicam ausência de diferença estatística.

4.4.4 Frações lipídicas no primeiro dia de vida

As concentrações de TG e colesterol total das ratas nascidas de mães CTL, RC, PIO e RC+PIO apresentaram valores similares entre si no primeiro dia de vida (**Figs. 25A e 25B**).

Até o momento, não foi encontrado na literatura sobre os efeitos da exposição materna à RC e ao tratamento com PIO nas frações lipídicas da prole no 1ºDL.

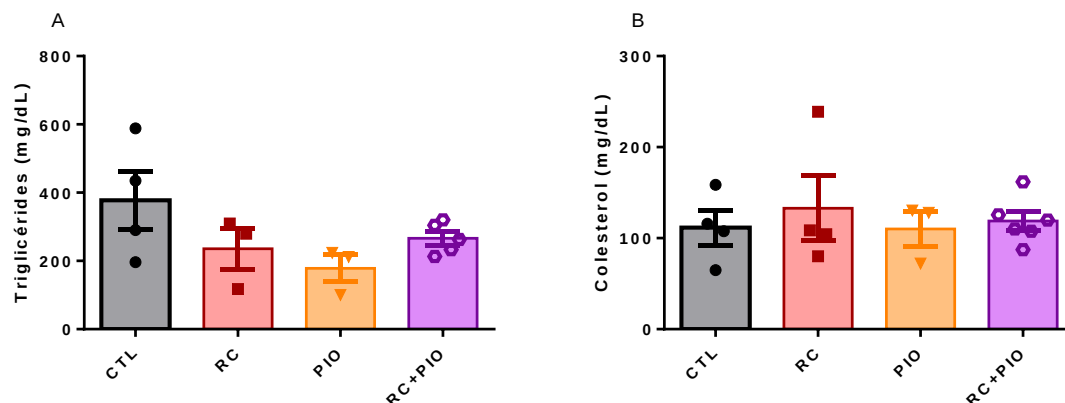


Figura 25 - Concentrações de TG **(A)** e colesterol **(B)** no soro dos neonatos de ratas CTL (n= 4), RC (n= 4), PIO (n= 3) e RC+PIO (n= 5) no dia 1 de lactação. Valores expressos como média $\pm$ SEM.

4.4.5 Frações lipídicas na vida adulta

Foi observada influência do fator tratamento materno com PIO sobre as concentrações de TG da prole adulta. As ratas nascidas de mães PIO e RC+PIO com 27 semanas de vida apresentaram diminuição de 30,8% na concentração de TG quando comparada as filhas de mães CTL ($p < 0,01$) (**Fig. 26A**). Por outro lado, as concentrações de colesterol total estiveram 24,9% maiores nas ratas nascidas de mães PIO em relação às que nasceram de mães CTL ($p < 0,05$) (**Fig. 26B**).

Ainda não foi descrito os impactos do tratamento materno com PIO nas concentrações de TG e colesterol total da prole fêmea adulta, porém, as ações diretas da PIO no metabolismo lipídico já são bem conhecidas. Em monoterapia, o uso da PIO em pacientes com DM2 causa diminuição significativa nas concentrações de TG a partir da redução de VLDL, além do aumento das concentrações de HDL (135, 136).

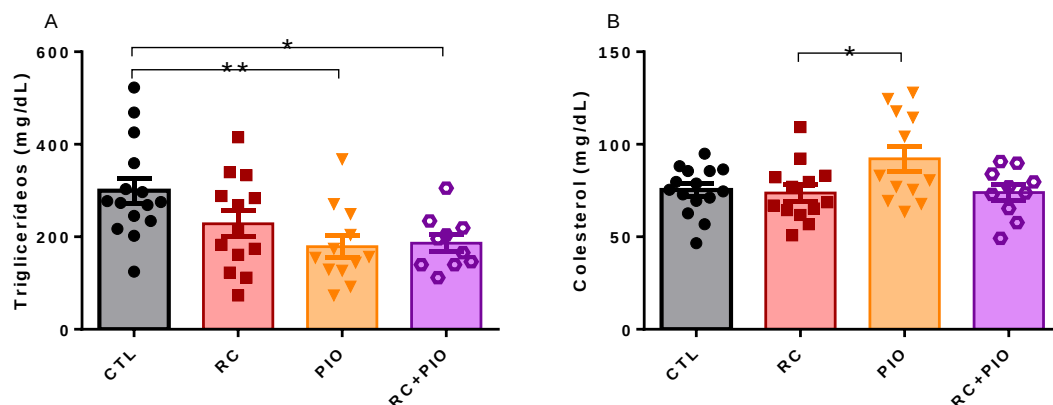


Figura 26 – Concentração de TG (A) e colesterol (B) no soro das fêmeas nascidas de mães CTL, RC, PIO e RC+PIO com 27 semanas de vida e em estado alimentado (CTL n= 15, RC n= 13, PIO n= 12 e RC+PIO n= 10). Valores foram expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: *p<0,05; **p<0,01. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.6 Níveis hepáticos de TG

Não encontramos diferenças entre as quantidades de TG nos fígados das fêmeas nascidas de mães CTL, RC, PIO e RC+PIO com 27 semanas de vida (**Fig. 27**).

Assim como nos impactos sobre a trigliceridemia, não há descrito até o momento se o tratamento com PIO durante a gestação modifica os níveis hepáticos de TG na prole. A PIO, entretanto, é capaz de diminuir os níveis de TG hepático em camundongos depletados de apoE funcional e também em ratos tratados com frutose (137, 138).

Dessa maneira, podemos observar que a PIO pode alterar os níveis hepáticos de TG quando há comorbidades, o que não ocorre nas proles do nosso estudo.

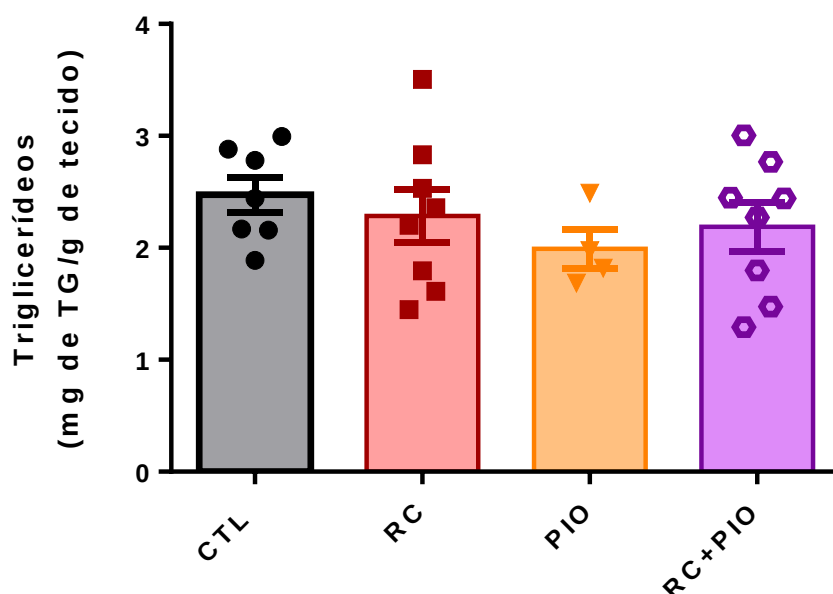


Figura 27 – Quantidade de TG no fígado de ratas nascidas de mães CTL (n=7), RC (n=8), PIO (n=4) e RC+PIO (n=8) com 27ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.7 Tolerância à glicose

Os resultados do GTT mostraram que não há efeito dos fatores exposição materna à RC e nem ao tratamento com PIO sobre a tolerância à glicose. Entretanto, ambos fatores interagiram de maneira significativa ($p=0,0275$). Na comparação grupo a grupo, podemos observar que houve aumento de 21,6% na AUC do GTT das filhas de mães PIO quando comparadas às filhas nascidas de mães CTL (**Fig. 28**).

Não há na literatura informações a respeito dos efeitos da exposição materna à PIO durante a gestação e a lactação, na tolerância à glicose dos filhotes fêmeas na vida adulta, contudo, em um estudo com indivíduos que apresentavam diminuição da tolerância à glicose, a administração crônica de PIO foi capaz de normalizar a tolerância à glicose (139). Em roedores, foi observado que os efeitos da PIO nos parâmetros glicêmicos podem apresentar variações de acordo com o sexo (140). Foi demonstrado no trabalho de Kalandarian e colaboradores que as proles fêmeas nascidas de mães expostas à dieta hipercalórica apresentaram aumento da tolerância à glicose após serem tratadas por 2 semanas com PIO, o que não foi notado na descendência masculina (140).

Em nossos resultados, mostrados na **Figura 28**, foi observado que ratas nascidas de mães PIO apresentaram diminuição da tolerância à glicose quando comparada às filhas

nascidas de mães CTL. O que é o contrário do efeito terapêutico da PIO, porém uma explicação para tal efeito é que as filhas de mães PIO tiveram *cacth up* total de crescimento, com aumento da ingestão alimentar e diminuição do gasto energético.

Por outro lado, a exposição materna à PIO foi incapaz de alterar a tolerância a glicose na prole fêmea quando houve presença simultânea da exposição materna à RC, pois tais filhas (RC+PIO) permaneceram pequenas ao longo de toda vida, consumiram menos alimentos e gastaram menos energia.

Também foi observado que a exposição materna à RC durante a gestação e lactação foi incapaz de alterar a tolerância à glicose das proles, o que corrobora com os dados da literatura (116).

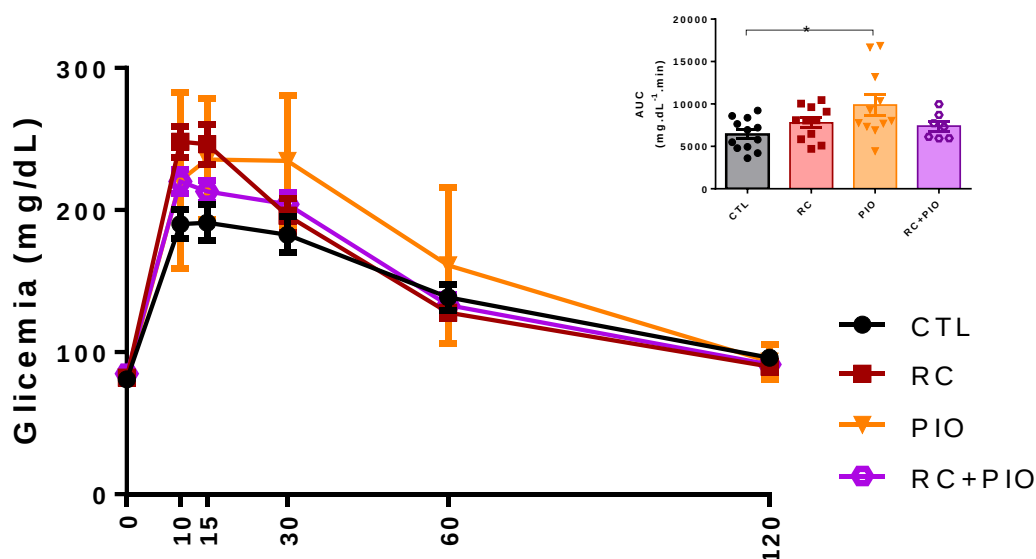


Figura 28 – Teste de tolerância à glicose na 24ª semana de vida das ratas advindas de mães CTL (n= 12), RC (n=11), PIO (n=11) e RC+PIO (n=7). Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.8 Sensibilidade à Insulina

As filhas que nasceram de mães que foram expostas à RC apresentaram aumento na sensibilidade à insulina na 25ª semana de vida (aumento de 50,4% quando comparada às filhas de mães que não foram expostas à RC, $p < 0,05$). A comparação grupo a grupo revelou um aumento de 67,8% na sensibilidade à insulina das filhas de mães RC+PIO

quando comparadas as filhas de mães CTL. Tal conclusão se sustenta com base nas comparações dos valores de K_{ITT} (**Fig. 29**).

O tratamento com PIO é capaz de promover melhora na sensibilidade à insulina em animais obesos (140-142). Em nossos resultados, podemos observar que o aumento da sensibilidade à insulina foi mais pronunciado nas fêmeas nascidas de mães que foram expostas à RC e tratadas com PIO durante a gestação e a lactação.

As filhas de mães que foram tratadas com PIO durante a gestação e a lactação apresentaram menor tolerância à glicose e não foi observado maior resistência à insulina. Camundongos com deficiência de $PPAR\gamma$ na presença de dieta hipercalórica apresentaram secreção de insulina diminuída (143). Dessa maneira, o efeito da diminuição da tolerância à glicose pela prole de mães PIO pode ser explicado talvez pela supressão do gene $PPAR\gamma$ nas ilhotas pancreáticas levando a menor secreção de insulina na presença de glicose.

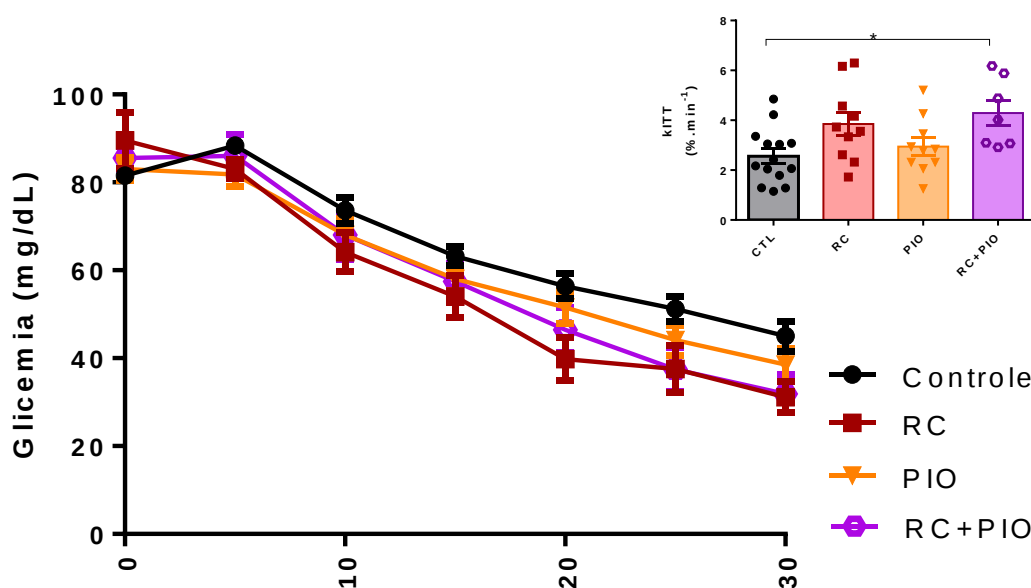


Figura 29 – Sensibilidade à insulina nas ratas nascidas de mães CTL (n= 14), RC (n= 10), PIO (n= 10) e RC+PIO(n=7) na 25ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.9 Peso relativo dos diferentes coxins de tecido adiposo

As filhas nascidas de mães expostas à RC apresentaram menor peso relativo do coxim perigonadal (36,2% menor do que daquelas nascidas de mães sem RC; $p = 0,0019$).

A comparação grupo a grupo mostrou, entretanto, que apenas as ratas nascidas de mães RC, ao contrário das nascidas de mães RC+PIO, apresentaram uma redução do peso relativo deste coxim (53% vs. CTL; $p < 0,01$) (**Fig. 30A**).

No caso do coxim retroperitoneal, foi observado um perfil semelhante de modulação. As filhas nascidas de mães expostas à RC apresentaram menor peso relativo do coxim retroperitoneal (29,3% menor do que daquelas nascidas de mães sem RC; $p = 0,0137$). A comparação grupo a grupo mostrou, entretanto, que apenas as ratas nascidas de mães RC, ao contrário das nascidas de mães RC+PIO, apresentaram uma redução do peso relativo deste coxim (43,8% vs. CTL; $p < 0,05$) (**Fig. 30B**).

O peso relativo do BAT foi menor nas filhas que nasceram de mães que foram tratadas com PIO (44% menor do que aquelas nascidas de mães não tratadas com PIO; $p < 0,0001$). O fator exposição materna à RC na gestação e na lactação não interferiu neste parâmetro na vida adulta da prole. (**Fig. 30C**).

Já é sabido que o aumento do tecido adiposo visceral está associada a diversas doenças cardiometabólicas (144). Em nossos resultados, pode-se observar que os pesos relativos dos coxins retroperitoneal e perigonadal das filhas de mães RC são menores do que das filhas de mães CTL.

Como mencionado anteriormente, a ativação de $PPAR\gamma$ induz a adipogênese, aumentando a capacidade de armazenamento de TG nos tecidos adiposos brancos, acarretando em aumento do peso corporal e adiposidade (79, 140). Entretanto, um estudo mostrou que a administração de agonista de $PPAR\gamma$ em animais durante a gestação foi incapaz de aumentar a adiposidade visceral dos fetos (145).

Não há na literatura descrição dos efeitos da exposição materna à PIO e as alterações do tecido adiposo marrom e branco na prole fêmea adulta, mas, ao analisarmos os nossos dados, podemos observar que a diminuição do gasto energético juntamente com a inflexibilidade metabólica das proles nascidas de mães que foram expostas ao tratamento com PIO foi acompanhada por aumento do peso relativo dos coxins viscerais e diminuição do peso relativo do BAT, seguido ainda de alterações na expressão de importantes genes.

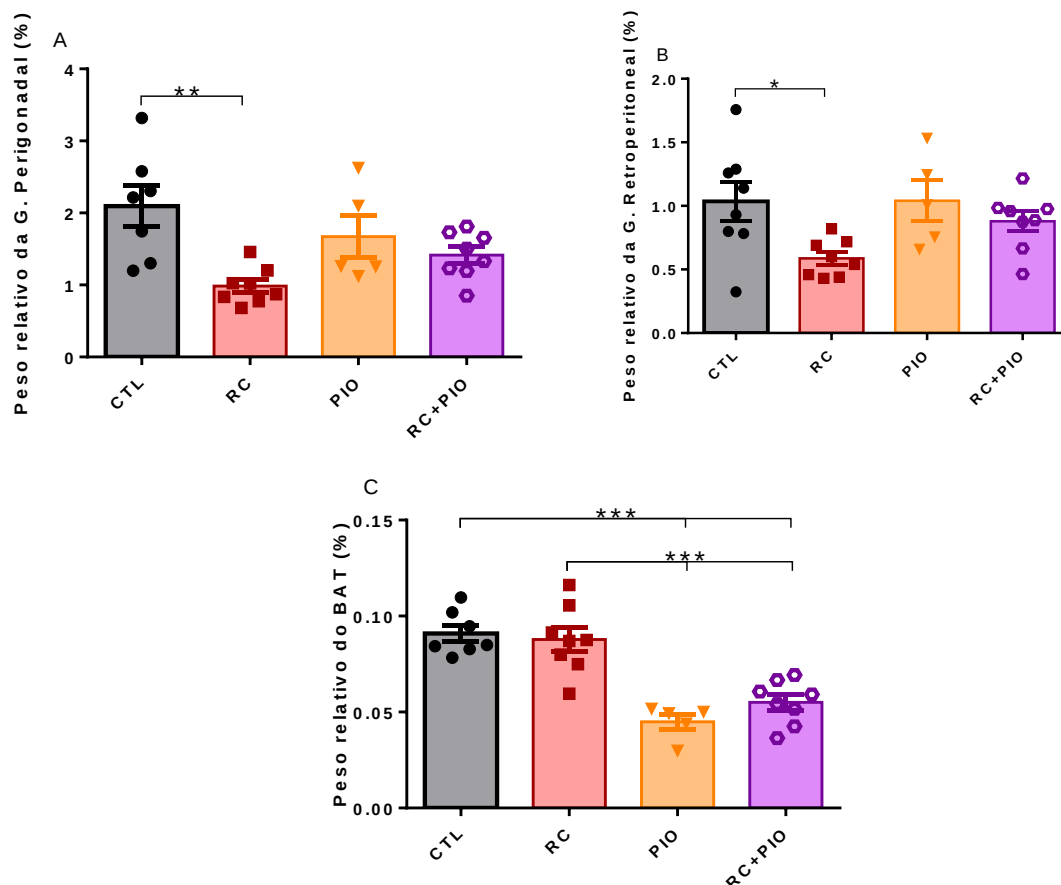


Figura 30 – Porcentagem do peso relativo dos coxins perigonadal (A) e retroperitoneal (B) e do BAT (C) de filhas nascidas de mães CTL (n= 7), RC (n= 8), PIO (n= 5) e RC+PIO (n= 8). Valores foram expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.10 Expressão de genes no coxim perigonadal

As expressões dos genes de PPAR γ , FASN, LPL, CD36 e DGAT1 não foram moduladas de maneira independente pelos fatores exposição materna à RC ou tratamento materno com a PIO (Figs. 31A, 31B, 31C, 31D e 31E).

Os fatores de exposição materna à RC e ao tratamento com PIO impostos nas mães durante a gestação e lactação não foram capazes de modular a expressão gênica de UCP1 e PGC1 α , porém houve efeito do fator interação ($p = 0,03$) (Fig. 31F e 31G).

A expressão do gene CPT1 na prole fêmea sofreu influência do fator exposição materna à RC, apresentando aumento de 80,3% da expressão de CPT1 quando comparadas às filhas de mães não expostas à RC ($p = 0,02$). O fator exposição materna à PIO não foi capaz de modular a expressão deste gene (Figs. 31H).

A expressão gênica de DGAT2 na prole fêmea não apresentou influência da exposição materna aos fatores RC e PIO, porém a expressão de DGAT2 sofreu influência do fator interação ($p=0,0164$). Na comparação grupo a grupo, podemos observar que houve redução da expressão de DGAT2 nas filhas de mães RC, PIO e RC+PIO ($p<0,05$ para todos os grupos) (**Fig. 31I**).

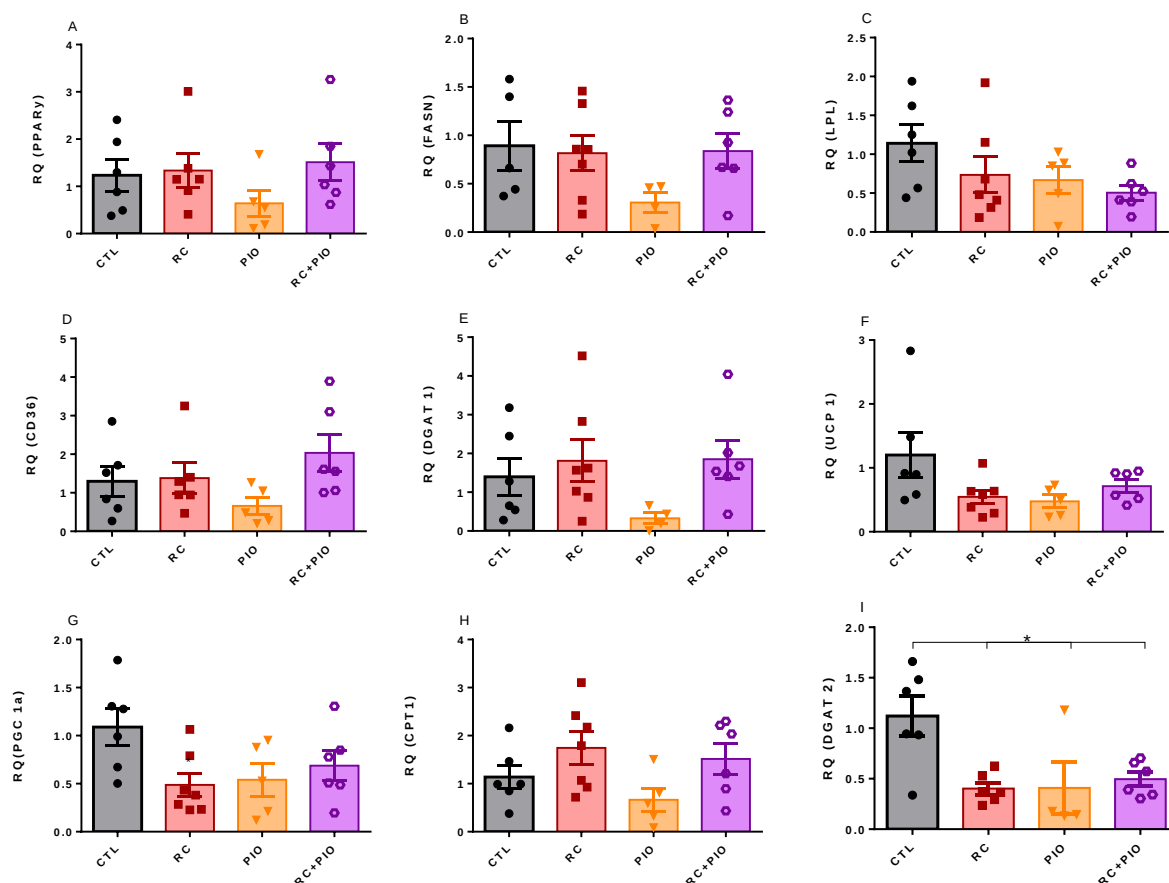


Figura 31 – Expressão de diferentes genes, PPAR γ (A), FASN (B), LPL (C), CD36 (D), DGAT1 (E), UCP1 (F), CPT1 (G), DGAT 2 (H), PGC1 α (I), no coxim perigonadal de filhas nascidas de mães CTL (n= 5-6), RC (n= 6-7), PIO (n= 4-5) e RC+PIO (n= 6) na 26ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p<0,05$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.11 Expressão de genes no coxim retroperitoneal

As expressões de PGC1 α , UCP1 e FASN não foram modulados pelos fatores RC materna ou tratamento materno com PIO (**Figs. 32A, 32B e 32C**).

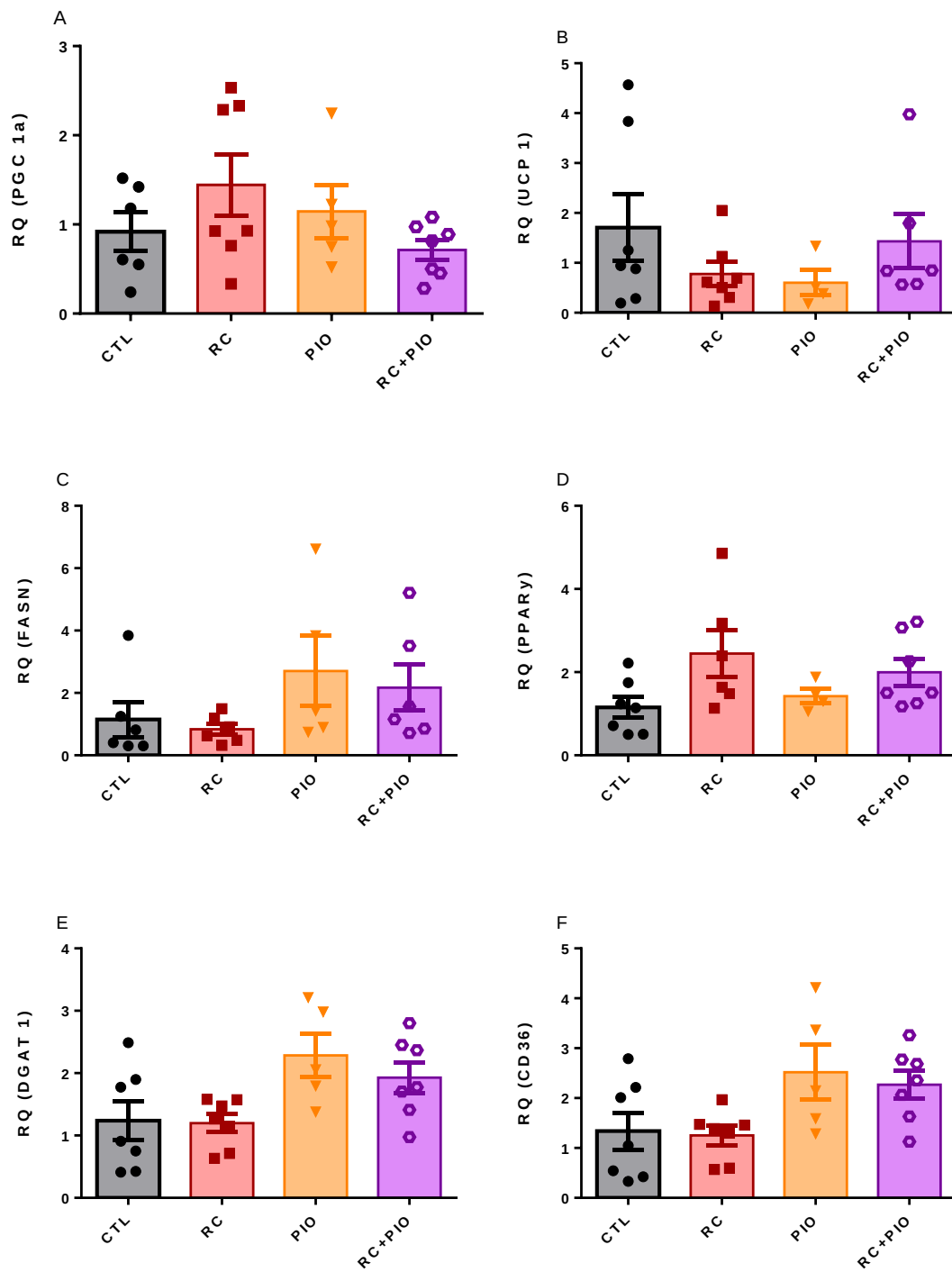
As filhas de mães que foram expostas à RC apresentaram aumento de 112,1% da expressão gênica de PPAR γ quando comparada às filhas de mães que não foram expostas

à RC ($p=0,025$). O fator tratamento materno com PIO não foi capaz de modular a expressão deste gene (**Fig. 32D**).

A expressão gênica de DGAT1, CD36, LPL, DGAT2 e CPT1 sofreu influência apenas do fator exposição materna ao tratamento com PIO (respectivamente, 72,9%, 84,9%, 228,1%, 143,7% e 49,7% maiores que as filhas de mães não tratadas com PIO $p<0,0001$, $p<0,001$, $p<0,001$, $p<0,001$ e $p<0,001$) (**Figs. 32E, 32F, 32G, 32H e 32I**).

Até o momento, não estão bem elucidadas as diferenças funcionais entre os tecidos adiposos retroperitoneais e perigonadais. Segundo Betz e colaboradores, a gordura retroperitoneal pode apresentar fenótipo semelhante ao BAT através do escurecimento do tecido e ainda pode ser regulada pelas mesmas ações fisiológicas que o BAT interescapular (146).

Ao analisarmos os dados, percebe-se que as filhas de mães que foram tratadas com PIO durante a gestação e a lactação apresentaram aumento da adiposidade e menor gasto energético concordando com o aumento da expressão gênica de DGAT1, DGAT2, CD36, LPL e CPT1, que são genes importantes no metabolismo de lipídeos, sendo responsáveis pela reesterificação e captação de ácidos graxos, hidrólise de lipídeos e beta-oxidação de ácidos graxos.



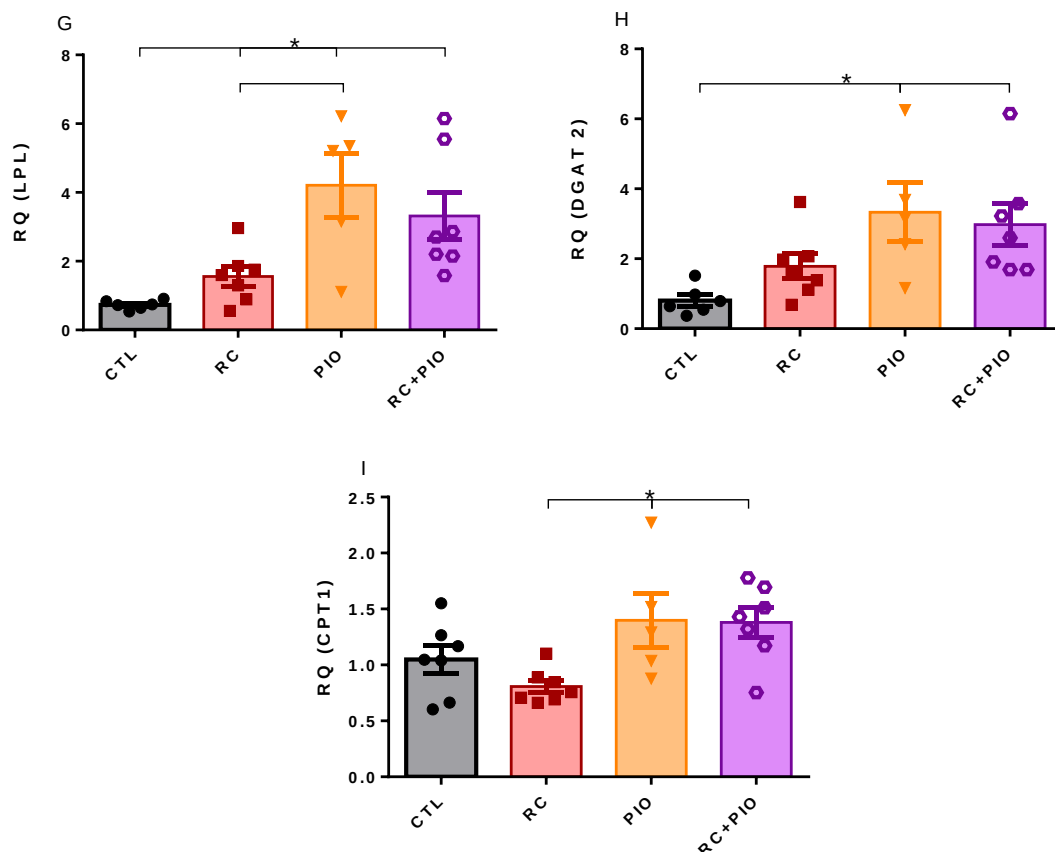


Figura 32 – Expressão de diferentes genes, PGC 1 α (A), UCP 1 (B), FASN (C), PPAR γ (D), DGAT1 (E), CD36 (F), LPL (G), DGAT 2 (H), CPT1 (I), no coxim retroperitoneal de ratas nascidas de mães CTL (n= 6-7), RC (n= 6-7), PIO (n= 4-5) e RC+PIO (n= 6-7) na 26ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. As diferenças estatísticas estão apresentadas da seguinte forma: * $p < 0,05$. Ausência de * indica ausência de diferença estatística.

4.4.12 Expressão de genes no BAT

O BAT é um tecido que desempenha um papel importante na termogênese adaptativa sem tremor e também na regulação da temperatura (147). Ele se difere dos tecidos adiposos brancos por possuir grande número de mitocôndrias e por dissipar energia através do desacoplamento da fosforilação oxidativa resultante da expressão da proteína de desacoplamento mitocondrial 1 (UCP1) (148).

Nossos resultados mostraram que a expressão do gene CideA no BAT da prole fêmea apresentou influência dos fatores de exposição materna à RC e ao tratamento com PIO. Quando comparamos grupo a grupo, observamos que houve uma redução de 99,9%, da expressão do gene CideA nas filhas de mães RC+PIO quando comparadas as filhas de mães CTL ($p < 0,05$) (Figs. 33A)

A expressão dos genes CideC, XdH e PPAR γ sofreu influência apenas do fator exposição materna ao tratamento com PIO. As filhas de mães tratadas com PIO apresentaram redução na expressão dos genes marcadores para diferenciação para adipócitos marrom, (respectivamente 121,2%, 56,9% e 50,1% menores do que as filhas de mães que não foram tratadas com PIO; $p=0,01$, $p=0,01$ e $p=0,02$) (**Figs. 33B, 33C e 33D**).

O gene relacionado à termogênese (UCP1) também foi modulado pelo fator exposição materna à PIO (redução 48,9%; $p=0,03$ vs. filhas de mães que não foram tratadas com PIO). Na análise grupo a grupo, apenas as filhas de mães RC+PIO apresentaram redução de 64,1% ($p<0,05$) na expressão deste gene quando comparadas as filhas de mães RC (**Fig. 33E**).

Sabe-se que a ativação do BAT aumenta o gasto energético, contribuindo para a redução da concentração de lipídeos e glicose circulantes e para maior gasto energético. Mulheres apresentam maior expressão de UCP1, além de níveis mais altos de tecido adiposo marrom (149-151).

Dessa maneira, podemos observar que a exposição materna à PIO foi capaz de diminuir a expressão de genes responsáveis pela diferenciação para adipócitos marrons, adipogênese, termogênese, armazenamento e formação de lipídeos, ações que justificam a diminuição do gasto energético.

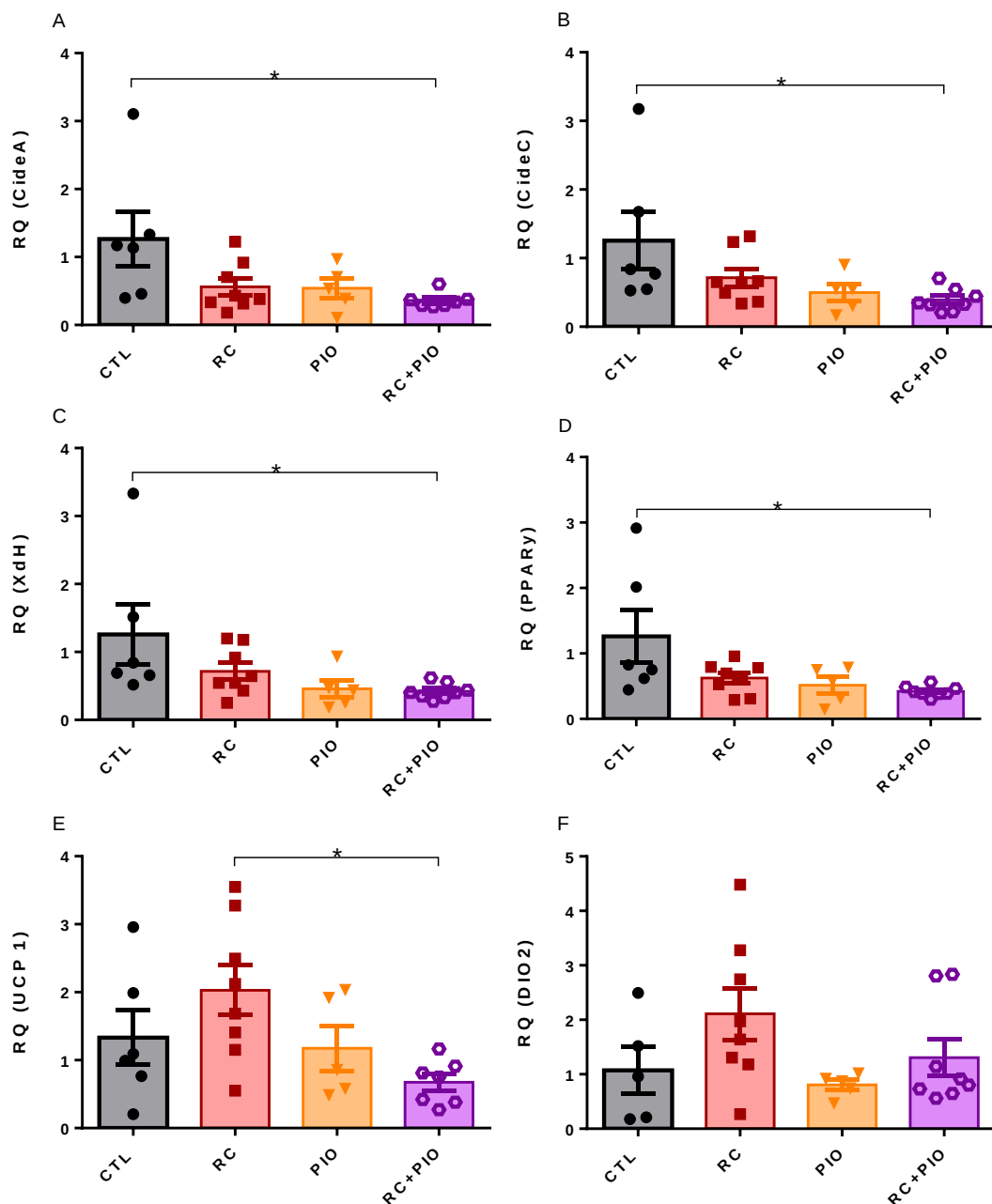


Figura 33 – Expressão de diferentes genes UCP1 (A), CideA (B), CideC (C), XdH (D), PPAR γ (E) no BAT de ratas nascidas de mães CTL (n= 6), RC (n= 8), PIO (n= 5) e RC+PIO (n= 7-8) na 26ª semana de vida. Valores expressos como média $\pm$ SEM. \$p<0,05 vs. animais sem RC; &p<0,05 vs. os animais sem PIO; #p<0,05 vs. grupo RC.

A recuperação de adiposidade na prole RC+PIO tem características diferentes daquela observada na prole RC+GEM. A prole RC+PIO adquiriu adiposidade visceral graças a redução do gasto calórico, que foi acompanhada de redução de marcadores de termogênese no BAT, bem como de seu peso relativo. Nossa interpretação é que o BAT

menor e com menor expressão de UCP1 provoca um desvio de fluxo de metabólitos com alta densidade energética para coxins viscerais, no caso, perigonadal e retroperitoneal, aumentando seu peso relativo.

A hipótese construída no parágrafo acima, a de que alterações extrínsecas ao coxim promovem aumento de seu peso relativo, são mais condizentes para o coxim perigonadal das proles RC+PIO, pois estes não apresentam aumento na expressão de genes relacionados à captação de ácidos graxos e reesterificação para TG. No caso do coxim retroperitoneal, há modificações intrínsecas a ele que justificam seu aumento de peso relativo, como maior expressão de CD36, LPL, DGAT1 e DGAT2.

Assim, é possível que mecanismos diferentes proporcionem o ganho de peso relativo de coxim retroperitoneal e perigonadal em prole de RC+PIO, sendo que o do segundo deve ser secundário às mudanças no BAT. Ademais, esta possível redução na capacidade termogênica do BAT na prole de RC+PIO é acompanhada de redução da expressão de genes que marcam a diferenciação para o adipócito marrom (Cidec, Cidea e Xdh). Tal fato é condizente com o desaparecimento da flexibilidade metabólica nas proles nascidas de RC+PIO.

Assim como para a prole nascida de RC+GEM, seria importante especular sobre o mecanismo pelo qual a prole nascida de RC+PIO apresentam estas diferenças em coxins distintos. A expressão do PPAR γ aparece reduzido no BAT da prole de mães tratadas com PIO (com ou sem RC). Dessa maneira, é possível que mudanças epigenéticas, como metilação de ilhas CpG, ocorram nos alvos diretos do PPAR γ da prole exposta precocemente à PIO, pois já é sabido que a hipermetilação de CpG na região promotora reduz a expressão de genes e que há relação inversa entre a metilação do PPAR γ e as dimensões corporais com supressão da adipogênese (152, 153).

De qualquer modo, dada a perda da flexibilidade metabólica e a redução do gasto calórico, os dados atuais sugerem que a exposição materna à PIO, ao contrário da exposição à GEM, não parece ser uma estratégia potencialmente interessante para a recuperação de peso ao longo da vida em uma prole nascida e amamentada por mães RC. Segundo o trabalho de Faerch e colaboradores, a inflexibilidade metabólica pode anteceder ao surgimento da resistência à insulina (154).

Dessa maneira, apesar das proles RC+PIO não apresentarem intolerância à glicose e nem resistência à insulina, a perda da flexibilidade metabólica é um indicativo que futuramente possam ocorrer alterações no metabolismo glicídico da prole ou serem

exacerbadas por ocasiões de alterações na dieta, como, por exemplo, a exposição à dieta hiperlipídica.

5. CONCLUSÃO

O tratamento com GEM ou PIO exercem impactos diferentes nas proles de mães que foram tratadas com tais drogas e expostas à RC durante a gestação e a lactação demonstrando um complexo fenômeno de programação materno-fetal.

O consumo de GEM por mães expostas à RC gera uma prole que tem a capacidade de consumir mais alimento e modificar o ganho de peso ao longo da vida. O consumo materno de GEM também faz com que a prole de mães exposta à RC tenha maior adiposidade na vida adulta. Interessantemente, este ganho de adiposidade é acompanhado de menor acúmulo de gordura no fígado e menor produção de VLDL na vida adulta. Além disto, o ganho de adiposidade não é acompanhado de menor gasto energético e não está associado à resistência à insulina ou intolerância à glicose.

O consumo de PIO por mães expostas à RC, entretanto, gerou proles que não apresentaram maior peso corporal, mas aumentaram a adiposidade visceral. Além disto, as proles nascidas de mães expostas à PIO apresentaram redução do gasto energético e inflexibilidade metabólica. Tais efeitos são acompanhados por uma diminuição da expressão de UCP1 no BAT, bem como menor peso relativo deste coxim. A exposição materna à PIO também aumenta a expressão de genes relacionados a reesterificação e captação de ácidos graxos, hidrólise de lipídeos e beta-oxidação de ácidos graxos no coxim retroperitoneal da prole.

Dessa maneira, concluímos que o uso de agonista PPAR α (GEM) em mães expostas à RC durante a gestação e lactação é capaz de programar um ganho de peso corporal adequado, com *catch up* parcial sem alterações deletérias ao metabolismo. Enquanto que o uso de agonista PPAR γ (PIO) em mães expostas à RC durante a gestação e lactação não tem o mesmo potencial na programação do peso, podendo acarretar alterações metabólicas desfavoráveis futuramente.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monk D, Moore GE. Intrauterine growth restriction--genetic causes and consequences. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2004;9(5):371-8.
2. Longo S, Borghesi A, Tzialla C, Stronati M. IUGR and infections. *Early Hum Dev.* 2014;90 Suppl 1:S42-4.
3. Sharma D, Shastri S, Farahbakhsh N, Sharma P. Intrauterine growth restriction - part 1. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016;29(24):3977-87.
4. Romo A, Carceller R, Tobajas J. Intrauterine growth retardation (IUGR): epidemiology and etiology. *Pediatr Endocrinol Rev.* 2009;6 Suppl 3:332-6.
5. Kesavan K, Devaskar SU. Intrauterine Growth Restriction: Postnatal Monitoring and Outcomes. *Pediatr Clin North Am.* 2019;66(2):403-23.
6. de Onis M, Blössner M, Villar J. Levels and patterns of intrauterine growth retardation in developing countries. *Eur J Clin Nutr.* 1998;52 Suppl 1:S5-15.
7. Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006;49(2):270-83.
8. Frøen JF, Gardosi JO, Thurmann A, Francis A, Stray-Pedersen B. Restricted fetal growth in sudden intrauterine unexplained death. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2004;83(9):801-7.
9. Hales CN, Barker DJ, Clark PM, Cox LJ, Fall C, Osmond C, et al. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *BMJ.* 1991;303(6809):1019-22.
10. Ibáñez L, Potau N, Francois I, de Zegher F. Precocious pubarche, hyperinsulinism, and ovarian hyperandrogenism in girls: relation to reduced fetal growth. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(10):3558-62.
11. Webster RP, Roberts VH, Myatt L. Protein nitration in placenta - functional significance. *Placenta.* 2008;29(12):985-94.
12. Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O, Durak I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest.* 2007;64(4):187-92.
13. Rashid CS, Bansal A, Simmons RA. Oxidative Stress, Intrauterine Growth Restriction, and Developmental Programming of Type 2 Diabetes. *Physiology (Bethesda).* 2018;33(5):348-59.
14. Sen S, Simmons RA. Maternal antioxidant supplementation prevents adiposity in the offspring of Western diet-fed rats. *Diabetes.* 2010;59(12):3058-65.

15. Giussani DA, Camm EJ, Niu Y, Richter HG, Blanco CE, Gottschalk R, et al. Developmental programming of cardiovascular dysfunction by prenatal hypoxia and oxidative stress. *PLoS One*. 2012;7(2):e31017.
16. Tarry-Adkins JL, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves IP, Neergheen V, Aiken CE, Martin-Gronert MS, et al. Coenzyme Q10 prevents hepatic fibrosis, inflammation, and oxidative stress in a male rat model of poor maternal nutrition and accelerated postnatal growth. *Am J Clin Nutr*. 2016;103(2):579-88.
17. Edwards CR, Benediktsson R, Lindsay RS, Seckl JR. Dysfunction of placental glucocorticoid barrier: link between fetal environment and adult hypertension? *Lancet*. 1993;341(8841):355-7.
18. Soto N, Bazaes RA, Peña V, Salazar T, Avila A, Iñiguez G, et al. Insulin sensitivity and secretion are related to catch-up growth in small-for-gestational-age infants at age 1 year: results from a prospective cohort. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(8):3645-50.
19. Priante E, Verlato G, Giordano G, Stocchero M, Visentin S, Mardegan V, et al. Intrauterine Growth Restriction: New Insight from the Metabolomic Approach. *Metabolites*. 2019;9(11).
20. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. *Diabetologia*. 1992;35(7):595-601.
21. Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001;60:5-20.
22. Ravelli GP, Stein ZA, Susser MW. Obesity in young men after famine exposure in utero and early infancy. *N Engl J Med*. 1976;295(7):349-53.
23. Parsons TJ, Power C, Manor O. Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. *BMJ*. 2001;323(7325):1331-5.
24. Singhal A. Long-Term Adverse Effects of Early Growth Acceleration or Catch-Up Growth. *Ann Nutr Metab*. 2017;70(3):236-40.
25. Zheng RD, Wang WJ, Ying YQ, Luo XP. [Effects of intrauterine growth retardation with catch-up growth on sugar-lipid metabolism and adipocyte function in young rats]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2012;14(7):543-7.
26. Iñiguez G, Ong K, Bazaes R, Avila A, Salazar T, Dunger D, et al. Longitudinal changes in insulin-like growth factor-I, insulin sensitivity, and secretion from birth to age three years in small-for-gestational-age children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(11):4645-9.
27. Hanson MA, Gluckman PD. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? *Physiol Rev*. 2014;94(4):1027-76.

28. Lakshmy R. Metabolic syndrome: role of maternal undernutrition and fetal programming. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14(3):229-40.
29. Devarajan A, Rajasekaran NS, Valburg C, Ganapathy E, Bindra S, Freije WA. Maternal perinatal calorie restriction temporally regulates the hepatic autophagy and redox status in male rat. *Free Radic Biol Med*. 2019;130:592-600.
30. Carr DJ, Milne JS, Aitken RP, Adam CL, Wallace JM. Hepatic IGF1 DNA methylation is influenced by gender but not by intrauterine growth restriction in the young lamb. *J Dev Orig Health Dis*. 2015;6(6):558-72.
31. Yang CH, Lin YD, Chiang YC, Chuang LY. A Hybrid Approach for CpG Island Detection in the Human Genome. *PLoS One*. 2016;11(1):e0144748.
32. Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes, and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*. 2004;20(1):63-8.
33. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16(1):6-21.
34. Park JH, Stoffers DA, Nicholls RD, Simmons RA. Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. *J Clin Invest*. 2008;118(6):2316-24.
35. Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr*. 2005;135(6):1382-6.
36. Tosh DN, Fu Q, Callaway CW, McKnight RA, McMillen IC, Ross MG, et al. Epigenetics of programmed obesity: alteration in IUGR rat hepatic IGF1 mRNA expression and histone structure in rapid vs. delayed postnatal catch-up growth. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299(5):G1023-9.
37. Lim K, Armitage JA, Stefanidis A, Oldfield BJ, Black MJ. IUGR in the absence of postnatal "catch-up" growth leads to improved whole body insulin sensitivity in rat offspring. *Pediatr Res*. 2011;70(4):339-44.
38. Zimanyi MA, Denton KM, Forbes JM, Thallas-Bonke V, Thomas MC, Poon F, et al. A developmental nephron deficit in rats is associated with increased susceptibility to a secondary renal injury due to advanced glycation end-products. *Diabetologia*. 2006;49(4):801-10.
39. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Thamotharan S, Shin BC, Stout D, et al. Early postnatal caloric restriction protects adult male intrauterine growth-restricted offspring from obesity. *Diabetes*. 2012;61(6):1391-8.
40. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*. 1995;83(6):835-9.

41. Bookout AL, Jeong Y, Downes M, Yu RT, Evans RM, Mangelsdorf DJ. Anatomical profiling of nuclear receptor expression reveals a hierarchical transcriptional network. *Cell*. 2006;126(4):789-99.
42. Guo C, Li Y, Gow CH, Wong M, Zha J, Yan C, et al. The optimal corepressor function of nuclear receptor corepressor (NCoR) for peroxisome proliferator-activated receptor γ requires G protein pathway suppressor 2. *J Biol Chem*. 2015;290(6):3666-79.
43. Berger JP, Akiyama TE, Meinke PT. PPARs: therapeutic targets for metabolic disease. *Trends Pharmacol Sci*. 2005;26(5):244-51.
44. Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem*. 2019;166:502-13.
45. Magee TR, Han G, Cherian B, Khorram O, Ross MG, Desai M. Down-regulation of transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor in programmed hepatic lipid dysregulation and inflammation in intrauterine growth-restricted offspring. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(3):271.e1-5.
46. Asami-Miyagishi R, Iseki S, Usui M, Uchida K, Kubo H, Morita I. Expression and function of PPAR γ in rat placental development. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;315(2):497-501.
47. McCarthy FP, Delany AC, Kenny LC, Walsh SK. PPAR- γ -- a possible drug target for complicated pregnancies. *Br J Pharmacol*. 2013;168(5):1074-85.
48. Cheng HS, Tan WR, Low ZS, Marvalim C, Lee JYH, Tan NS. Exploration and Development of PPAR Modulators in Health and Disease: An Update of Clinical Evidence. *Int J Mol Sci*. 2019;20(20).
49. Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, Evans RM, Martin KJ, Zhang M, et al. Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR γ . *Mol Cell*. 1998;1(3):465-70.
50. Tavares V, Hirata MH, Hirata RD. [Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ): molecular study in glucose homeostasis, lipid metabolism and therapeutic approach]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(4):526-33.
51. Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409-35.
52. Monsalve FA, Pyarasani RD, Delgado-Lopez F, Moore-Carrasco R. Peroxisome proliferator-activated receptor targets for the treatment of metabolic diseases. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:549627.
53. Bougarne N, Weyers B, Desmet SJ, Deckers J, Ray DW, Staels B, et al. Molecular Actions of PPAR α in Lipid Metabolism and Inflammation. *Endocr Rev*. 2018;39(5):760-802.

54. Toral M, Romero M, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J, Jiménez R. Antihypertensive effects of peroxisome proliferator-activated receptor- β/δ activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2017;312(2):H189-H200.
55. Vázquez-Carrera M. Unraveling the Effects of PPAR β/δ on Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(5):319-34.
56. Braissant O, Foulle F, Scotto C, Dauça M, Wahli W. Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat. *Endocrinology*. 1996;137(1):354-66.
57. Shearer BG, Billin AN. The next generation of PPAR drugs: do we have the tools to find them? *Biochim Biophys Acta*. 2007;1771(8):1082-93.
58. Blaschke F, Takata Y, Caglayan E, Law RE, Hsueh WA. Obesity, peroxisome proliferator-activated receptor, and atherosclerosis in type 2 diabetes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(1):28-40.
59. Kersten S. Integrated physiology and systems biology of PPAR α . *Mol Metab*. 2014;3(4):354-71.
60. Leone TC, Weinheimer CJ, Kelly DP. A critical role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in the cellular fasting response: the PPARalpha-null mouse as a model of fatty acid oxidation disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(13):7473-8.
61. Kersten S, Seydoux J, Peters JM, Gonzalez FJ, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha mediates the adaptive response to fasting. *J Clin Invest*. 1999;103(11):1489-98.
62. Kersten S, Stienstra R. The role and regulation of the peroxisome proliferator activated receptor alpha in human liver. *Biochimie*. 2017;136:75-84.
63. Dubois V, Eeckhoutte J, Lefebvre P, Staels B. Distinct but complementary contributions of PPAR isotypes to energy homeostasis. *J Clin Invest*. 2017;127(4):1202-14.
64. Farmacopéia Brasileira. Edição 6 ed2019.
65. Roy A, Pahan K. Gemfibrozil, stretching arms beyond lipid lowering. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2009;31(3):339-51.
66. Spencer CM, Barradell LB. Gemfibrozil. A reappraisal of its pharmacological properties and place in the management of dyslipidaemia. *Drugs*. 1996;51(6):982-1018.
67. Scatena R, Bottoni P, Giardina B. Mitochondria, PPARs, and Cancer: Is Receptor-Independent Action of PPAR Agonists a Key? *PPAR Res*. 2008;2008:256251.
68. Faludi AA IM, Saraiva JFK, Chacra APM, Bianco HT, Afiune Neto A, Bertolami A, Pereira AC,, Lottenberg AM SA, Chagas ACP, Casella-Filho A, Simão AF, Alencar Filho AC, Caramelli, B MC, Magnoni D, Negrão CE, Ferreira CES, Scherr C, Feio CMA,

Kovacs C, Araújo DB,, Calderaro D GD, Mello Junior EP, Alexandre ERG, Sato IE, Moriguchi EH, Rached FH,, Santos FC CF, Fonseca FAH, Fonseca HAR, Xavier HT, Pimentel IC, Giuliano ICB, Issa JS,, Diamant J PJ, Santos JE, Faria Neto JR, Melo Filho JX, Kato JT, Torres KP, Bertolami MC,, et al. Atualização da DIRETRIZ Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose. Arquivos Brasileiros de Cardiologia 2017.

69. Nash DT. Hyperlipoproteinemia, atherosclerosis and gemfibrozil. *Angiology*. 1982;33(9):594-602.

70. de Salcedo I, Gorringe AL, Silva JL, Santos JA. Gemfibrozil in a group of diabetics. *Proc R Soc Med*. 1976;69 Suppl 2:64-70.

71. Chandra S, Pahan K. Gemfibrozil, a Lipid-Lowering Drug, Lowers Amyloid Plaque Pathology and Enhances Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease via Peroxisome Proliferator-Activated Receptor. *J Alzheimers Dis Rep*. 2019;3(1):149-68.

72. StatPearls. 2020.

73. Simsolo RB, Ong JM, Kern PA. Effect of gemfibrozil on adipose tissue and muscle lipoprotein lipase. *Metabolism*. 1993;42(11):1486-91.

74. Fitzgerald JE, Petrere JA, de la Iglesia FA. Experimental studies on reproduction with the lipid-regulating agent gemfibrozil. *Fundam Appl Toxicol*. 1987;8(4):454-64.

75. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*. 1994;79(7):1147-56.

76. Lehrke M, Lazar MA. The many faces of PPARgamma. *Cell*. 2005;123(6):993-9.

77. Li M, Pascual G, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4699-707.

78. Anvisa. [cited 2010. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=400778&_101_type=content&_101_groupId=33868&_101_urlTitle=alerta-snvs-anvisa-nuvig-gfarm-n-04-de-29-de-setembro-de-2010&inheritRedirect=true.

79. Okuno A, Tamemoto H, Tobe K, Ueki K, Mori Y, Iwamoto K, et al. Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats. *J Clin Invest*. 1998;101(6):1354-61.

80. Rangwala SM, Lazar MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma in diabetes and metabolism. *Trends Pharmacol Sci*. 2004;25(6):331-6.

81. Mudaliar S, Chang AR, Henry RR. Thiazolidinediones, peripheral edema, and type 2 diabetes: incidence, pathophysiology, and clinical implications. *Endocr Pract*. 2003;9(5):406-16.

82. Bajpeyi S, Pasarica M, Conley KE, Newcomer BR, Jubrias SA, Gamboa C, et al. Pioglitazone-induced improvements in insulin sensitivity occur without concomitant changes in muscle mitochondrial function. *Metabolism*. 2017;69:24-32.
83. Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, et al. Loss-of-function mutations in PPAR gamma associated with human colon cancer. *Mol Cell*. 1999;3(6):799-804.
84. Sohda T, Momose Y, Meguro K, Kawamatsu Y, Sugiyama Y, Ikeda H. Studies on antidiabetic agents. Synthesis and hypoglycemic activity of 5-[4-(pyridylalkoxy)benzyl]-2,4-thiazolidinediones. *Arzneimittelforschung*. 1990;40(1):37-42.
85. Al-Majed A, Bakheit AH, Abdel Aziz HA, Alharbi H, Al-Jenoobi FI. Pioglitazone. *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol*. 2016;41:379-438.
86. Devchand PR, Liu T, Altman RB, FitzGerald GA, Schadt EE. The Pioglitazone Trek via Human PPAR Gamma: From Discovery to a Medicine at the FDA and Beyond. *Front Pharmacol*. 2018;9:1093.
87. Yki-Järvinen H. Thiazolidinediones. *N Engl J Med*. 2004;351(11):1106-18.
88. Fujita Y, Yamada Y, Kusama M, Yamauchi T, Kamon J, Kadowaki T, et al. Sex differences in the pharmacokinetics of pioglitazone in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*. 2003;136(1):85-94.
89. Briggs GG FR, Yaffe SJ. *Drugs in pregnancy and lactation*. 7th ed 2005.
90. *Drugs and Lactation Database (LactMed)*. 2006.
91. Thamotharan M, Shin BC, Suddirikku DT, Thamotharan S, Garg M, Devaskar SU. GLUT4 expression and subcellular localization in the intrauterine growth-restricted adult rat female offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2005;288(5):E935-47.
92. Khalaj L, Nejad SC, Mohammadi M, Zadeh SS, Pour MH, Ahmadiani A, et al. Gemfibrozil pretreatment proved protection against acute restraint stress-induced changes in the male rats' hippocampus. *Brain Res*. 2013;1527:117-30.
93. Gemfibrozil [Available from: https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_cb9154247.htm.
94. Shahataa MG, Mostafa-Hedeab G, Ali EF, Mahdi EA, Mahmoud FA. Effects of telmisartan and pioglitazone on high fructose induced metabolic syndrome in rats. *Can J Physiol Pharmacol*. 2016;94(8):907-17.
95. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Pioglitazone, CID=4829, [Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pioglitazone>.
96. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. 1957;226(1):497-509.

97. Rodríguez-Sureda V, Peinado-Onsurbe J. A procedure for measuring triacylglyceride and cholesterol content using a small amount of tissue. *Anal Biochem.* 2005;343(2):277-82.
98. Kim DH, Zhang T, Lee S, Calabuig-Navarro V, Yamauchi J, Piccirillo A, et al. FoxO6 integrates insulin signaling with MTP for regulating VLDL production in the liver. *Endocrinology.* 2014;155(4):1255-67.
99. Faria JA, de Araújo TM, Razolli DS, Ignácio-Souza LM, Souza DN, Bordin S, et al. Metabolic Impact of Light Phase-Restricted Fructose Consumption Is Linked to Changes in Hypothalamic AMPK Phosphorylation and Melatonin Production in Rats. *Nutrients.* 2017;9(4).
100. Kaiyala KJ, Ramsay DS. Direct animal calorimetry, the underused gold standard for quantifying the fire of life. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2011;158(3):252-64.
101. Lam YY, Ravussin E. Indirect calorimetry: an indispensable tool to understand and predict obesity. *Eur J Clin Nutr.* 2017;71(3):318-22.
102. Palkar PS, Anderson CR, Ferry CH, Gonzalez FJ, Peters JM. Effect of prenatal peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) agonism on postnatal development. *Toxicology.* 2010;276(1):79-84.
103. Herrera E, Lasunción MA, Gomez-Coronado D, Aranda P, López-Luna P, Maier I. Role of lipoprotein lipase activity on lipoprotein metabolism and the fate of circulating triglycerides in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;158(6 Pt 2):1575-83.
104. Lesage J, Blondeau B, Grino M, Bréant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology.* 2001;142(5):1692-702.
105. Larsen PJ, Jensen PB, Sørensen RV, Larsen LK, Vrang N, Wulff EM, et al. Differential influences of peroxisome proliferator-activated receptors gamma and -alpha on food intake and energy homeostasis. *Diabetes.* 2003;52(9):2249-59.
106. Dumont M, Mauriège P, Bergeron J, Després JP, Prud'homme D. Effect of a six month gemfibrozil treatment and dietary recommendations on the metabolic risk profile of visceral obese men. *Int J Obes Relat Metab Disord.* 2001;25(8):1136-43.
107. Mancini FP, Lanni A, Sabatino L, Moreno M, Giannino A, Contaldo F, et al. Fenofibrate prevents and reduces body weight gain and adiposity in diet-induced obese rats. *FEBS Lett.* 2001;491(1-2):154-8.
108. Todd PA, Ward A. Gemfibrozil. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in dyslipidaemia. *Drugs.* 1988;36(3):314-39.

109. Fruchart JC, Duriez P. Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today (Barc)*. 2006;42(1):39-64.
110. Singh I, Lazo O. Peroxisomal enzyme activities in brain and liver of pups of lactating mothers treated with ciprofibrate. *Neurosci Lett*. 1992;138(2):283-6.
111. Tang S, Wu F, Lin X, Gui W, Zheng F, Li H. The Effects of New Selective PPAR. *J Diabetes Res*. 2020;2020:4179852.
112. Staels B, Vu-Dac N, Kosykh VA, Saladin R, Fruchart JC, Dallongeville J, et al. Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates. *J Clin Invest*. 1995;95(2):705-12.
113. Olivecrona G. Role of lipoprotein lipase in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 2016;27(3):233-41.
114. Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart JC. Mechanism of action of fibrates on lipid and lipoprotein metabolism. *Circulation*. 1998;98(19):2088-93.
115. Elkins C, Friedrich D. Hypertriglyceridemia: A review of the evidence. *Nurse Pract*. 2018;43(10):22-9.
116. Escrivá F, Rodríguez C, Cacho J, Alvarez C, Portha B, Pascual-Leone AM. Glucose utilization and insulin action in adult rats submitted to prolonged food restriction. *Am J Physiol*. 1992;263(1 Pt 1):E1-7.
117. Garg M, Thamotharan M, Rogers L, Bassilian S, Lee WN, Devaskar SU. Glucose metabolic adaptations in the intrauterine growth-restricted adult female rat offspring. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;290(6):E1218-26.
118. De Toro-Martín J, Fernández-Millán E, Lizárraga-Mollinedo E, López-Oliva E, Serradas P, Escrivá F, et al. Predominant role of GIP in the development of a metabolic syndrome-like phenotype in female Wistar rats submitted to forced catch-up growth. *Endocrinology*. 2014;155(10):3769-80.
119. Garg M, Thamotharan M, Dai Y, Lagishetty V, Matveyenko AV, Lee WN, et al. Glucose intolerance and lipid metabolic adaptations in response to intrauterine and postnatal calorie restriction in male adult rats. *Endocrinology*. 2013;154(1):102-13.
120. Gremlich S, Nolan C, Roduit R, Burcelin R, Peyot ML, Delghingaro-Augusto V, et al. Pancreatic islet adaptation to fasting is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcriptional up-regulation of fatty acid oxidation. *Endocrinology*. 2005;146(1):375-82.
121. Ibrahim MM. Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obes Rev*. 2010;11(1):11-8.

122. Palmer BF, Clegg DJ. The sexual dimorphism of obesity. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;402:113-9.
123. Kissebah AH, Krakower GR. Regional adiposity and morbidity. *Physiol Rev*. 1994;74(4):761-811.
124. Carr DB, Utzschneider KM, Hull RL, Kodama K, Retzlaff BM, Brunzell JD, et al. Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. *Diabetes*. 2004;53(8):2087-94.
125. Björntorp P. "Portal" adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis*. 1990;10(4):493-6.
126. Nielsen S, Guo Z, Johnson CM, Hensrud DD, Jensen MD. Splanchnic lipolysis in human obesity. *J Clin Invest*. 2004;113(11):1582-8.
127. Fontana L, Eagon JC, Trujillo ME, Scherer PE, Klein S. Visceral fat adipokine secretion is associated with systemic inflammation in obese humans. *Diabetes*. 2007;56(4):1010-3.
128. Manolopoulos KN, Karpe F, Frayn KN. Gluteofemoral body fat as a determinant of metabolic health. *Int J Obes (Lond)*. 2010;34(6):949-59.
129. Pinnick KE, Nicholson G, Manolopoulos KN, McQuaid SE, Valet P, Frayn KN, et al. Distinct developmental profile of lower-body adipose tissue defines resistance against obesity-associated metabolic complications. *Diabetes*. 2014;63(11):3785-97.
130. Asnani S, Richard BC, Desouza C, Fonseca V. Is weight loss possible in patients treated with thiazolidinediones? Experience with a low-calorie diet. *Curr Med Res Opin*. 2003;19(7):609-13.
131. Klinkner DB, Lim HJ, Strawn EY, Oldham KT, Sander TL. An in vivo murine model of rosiglitazone use in pregnancy. *Fertil Steril*. 2006;86(4 Suppl):1074-9.
132. Saitoh Y, Liu R, Ueno H, Mizuta M, Nakazato M. Oral pioglitazone administration increases food intake through ghrelin-independent pathway in Zucker fatty rat. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007;77(3):351-6.
133. Palou M, Priego T, Sánchez J, Torrens JM, Palou A, Picó C. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. *Endocrinology*. 2010;151(3):1030-41.
134. Lu M, Sarruf DA, Talukdar S, Sharma S, Li P, Bandyopadhyay G, et al. Brain PPAR- γ promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nat Med*. 2011;17(5):618-22.
135. Goldberg RB, Kendall DM, Deeg MA, Buse JB, Zagar AJ, Pinaire JA, et al. A comparison of lipid and glycemic effects of pioglitazone and rosiglitazone in patients with type 2 diabetes and dyslipidemia. *Diabetes Care*. 2005;28(7):1547-54.

136. Schernthaner G, Matthews DR, Charbonnel B, Hanefeld M, Brunetti P, Group QcS. Efficacy and safety of pioglitazone versus metformin in patients with type 2 diabetes mellitus: a double-blind, randomized trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(12):6068-76.
137. Shen D, Li H, Zhou R, Liu MJ, Yu H, Wu DF. Pioglitazone attenuates aging-related disorders in aged apolipoprotein E deficient mice. *Exp Gerontol.* 2018;102:101-8.
138. Kazumi T, Hirano T, Odaka H, Ebara T, Amano N, Hozumi T, et al. VLDL triglyceride kinetics in Wistar fatty rats, an animal model of NIDDM: effects of dietary fructose alone or in combination with pioglitazone. *Diabetes.* 1996;45(6):806-11.
139. DeFronzo RA, Tripathy D, Schwenke DC, Banerji M, Bray GA, Buchanan TA, et al. Pioglitazone for diabetes prevention in impaired glucose tolerance. *N Engl J Med.* 2011;364(12):1104-15.
140. Kalanderian A, Abate N, Patrikeev I, Wei J, Vincent KL, Motamedi M, et al. Pioglitazone therapy in mouse offspring exposed to maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208(4):308.e1-7.
141. Yin QQ, Pei JJ, Xu S, Luo DZ, Dong SQ, Sun MH, et al. Pioglitazone improves cognitive function via increasing insulin sensitivity and strengthening antioxidant defense system in fructose-drinking insulin resistance rats. *PLoS One.* 2013;8(3):e59313.
142. Tozzo E, Bhat G, Cheon K, Camacho RC. Pioglitazone increases whole body insulin sensitivity in obese, insulin-resistant rhesus monkeys. *PLoS One.* 2015;10(5):e0126642.
143. Matsui J, Terauchi Y, Kubota N, Takamoto I, Eto K, Yamashita T, et al. Pioglitazone reduces islet triglyceride content and restores impaired glucose-stimulated insulin secretion in heterozygous peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-deficient mice on a high-fat diet. *Diabetes.* 2004;53(11):2844-54.
144. Hung CS, Lee JK, Yang CY, Hsieh HR, Ma WY, Lin MS, et al. Measurement of visceral fat: should we include retroperitoneal fat? *PLoS One.* 2014;9(11):e112355.
145. Muhlhausler BS, Morrison JL, McMillen IC. Rosiglitazone increases the expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma target genes in adipose tissue, liver, and skeletal muscle in the sheep fetus in late gestation. *Endocrinology.* 2009;150(9):4287-94.
146. Betz MJ, Slawik M, Lidell ME, Osswald A, Heglind M, Nilsson D, et al. Presence of brown adipocytes in retroperitoneal fat from patients with benign adrenal tumors: relationship with outdoor temperature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(10):4097-104.
147. Cousin B, Cinti S, Morroni M, Raimbault S, Ricquier D, Pénicaud L, et al. Occurrence of brown adipocytes in rat white adipose tissue: molecular and morphological characterization. *J Cell Sci.* 1992;103 (Pt 4):931-42.

148. Fenzl A, Kiefer FW. Brown adipose tissue and thermogenesis. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2014;19(1):25-37.
149. Ong FJ, Ahmed BA, Oreskovich SM, Blondin DP, Haq T, Konyer NB, et al. Recent advances in the detection of brown adipose tissue in adult humans: a review. *Clin Sci (Lond).* 2018;132(10):1039-54.
150. Cypess AM, Lehman S, Williams G, Tal I, Rodman D, Goldfine AB, et al. Identification and importance of brown adipose tissue in adult humans. *N Engl J Med.* 2009;360(15):1509-17.
151. Nookaew I, Svensson PA, Jacobson P, Jernås M, Taube M, Larsson I, et al. Adipose tissue resting energy expenditure and expression of genes involved in mitochondrial function are higher in women than in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(2):E370-8.
152. Volberg V, Yousefi P, Huen K, Harley K, Eskenazi B, Holland N. CpG Methylation across the adipogenic PPAR γ gene and its relationship with birthweight and child BMI at 9 years. *BMC Med Genet.* 2017;18(1):7.
153. Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003;33 Suppl:245-54.
154. Færch K, Vaag A. Metabolic inflexibility is a common feature of impaired fasting glycaemia and impaired glucose tolerance. *Acta Diabetol.* 2011;48(4):349-53.

7. ANEXOS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Efeito de agonistas de ppargamma ou pparalpa na programação metabólica decorrente de restrição calórica durante gestação e lactação, registrada com o nº 4343-1, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gabriel Forato Anhé e Vanessa Barbosa Veronesi, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em 24 de outubro de 2016.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	10/11/2016-01/08/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	10/11/2016-01/08/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	140
Peso / Idade:	11 semanas / 280g
Sexo:	20 machos / 120 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio**.

Campinas, 24 de outubro de 2016.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.



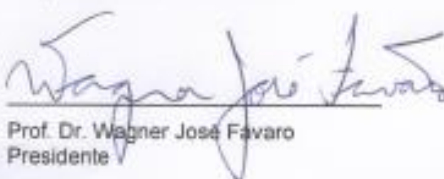
CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada Efeito de agonistas de γ -aminobutyric acid ou α -paraldehyde no gasto calórico materno e na adiposidade materna durante gestação e lactação, registrada com o nº 5007-1/2018, sob a responsabilidade de Prof. Dr. Gabriel Forato Anê e Vanessa Barbosa Veronesi, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em 18 de outubro de 2018.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	04/01/2019-01/08/2020
Vigência da autorização para manipulação animal:	04/01/2019-01/08/2020
Espécie / linhagem/ raça:	Rato heterogênico / HanUnib: WH (Wistar)
No. de animais:	100
Idade/Peso:	11 semanas / 280g
Sexo:	20 machos / 80 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Experimentação em Cronobiologia, FCM/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 18 de outubro de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Favaro
Presidente


Fátima Aloriso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.