

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**TESE**

**ESTUDO DA TRANSMISSÃO INTER- E TRANSGERACIONAL DE  
ALTERAÇÕES METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E  
CARDÍACAS NA PROLE DE CAMUNDONGOS OBESOS POR DUAS  
GERAÇÕES CONSECUTIVAS**

**SUELEN GUEDES ZECA**

**2020**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**ESTUDO DA TRANSMISSÃO INTER- E TRANSGERACIONAL DE  
ALTERAÇÕES METABÓLICAS, COMPORTAMENTAIS E  
CARDÍACAS NA PROLE DE CAMUNDONGOS OBESOS POR DUAS  
GERAÇÕES CONSECUTIVAS**

**SUELEN GUEDES ZECA**

*Sob a orientação da Professora*

**NORMA APARECIDA DOS SANTOS ALMEIDA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração Fisiologia e Farmacologia.

Seropédica, RJ

Setembro de 2020

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

G42e Guedes Zeca, Suelen, 1989-  
Estudo da transmissão inter- e transgeracional de alterações metabólicas, comportamentais e cardíacas na prole de camundongos obesos por duas gerações consecutivas / Suelen Guedes Zeca. - Seropédica, 2020. 99 f.

Orientadora: Norma Aparecida dos Santos Almeida. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas, 2020.

1. ecocardiograma. 2. epigenética. 3. obesidade materna. 4. obesidade paterna. I. dos Santos Almeida, Norma Aparecida, 1976-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



TERMO Nº 246/2020 - PPGCF (12.28.01.00.00.00.52)

Nº do Protocolo: 23083.047411/2020-43

Seropédica-RJ, 18 de setembro de 2020.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**SUELEN GUEDES ZECA**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor **em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: Fisiologia e Farmacologia.

TESE APROVADA EM 18/09/2020

**Membros da Banca:**

Prof Drª Norma Aparecida dos Santos Almeida (Membro Interno/Orientadora - UFRRJ)

Prof Dr Fábio Fagundes da Rocha (Membro Interno - UFRRJ)

Prof Dr David do Carmo Malvar (Membro Interno - UFRRJ)

Prof Drª Patrícia Cristina Lisboa da Silva (Membro Externo - UERJ)

Prof Drª Natália Galito Rocha Ayres (Membro Externo - UFF)

*Documento não acessível publicamente*

*(Assinado digitalmente em 19/09/2020 09:09)*

DAVID DO CARMO MALVAR  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptCF (12.28.01.00.00.00.48)  
Matricula: 3000663

*(Assinado digitalmente em 18/09/2020 21:36)*

FABIO FAGUNDES DA ROCHA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
PPGMCF (12.28.01.00.00.00.41)  
Matricula: 1519567

*(Assinado digitalmente em 18/09/2020 17:39)*  
NORMA APARECIDA DOS SANTOS ALMEIDA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
PPGCF (12.28.01.00.00.00.52)  
Matricula: 2479104

*(Assinado digitalmente em 18/09/2020 18:13)*  
PATRICIA CRISTINA LISBOA DA SILVA  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 015.812.737-46

*(Assinado digitalmente em 18/09/2020 18:06)*  
NATÁLIA GALITO ROCHA AYRES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 110.748.747-14

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número:  
**246**, ano: **2020**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **18/09/2020** e o código de verificação: **99ff4be4d3**

## **DEDICATÓRIA**

Para Jéssica e Nevinha. Cada momento nosso será parte do que sou para sempre. Obrigada por partilharem a vida comigo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, inicialmente, a todos e todas que participaram diretamente na confecção desse trabalho.

À CAPES, pelo apoio financeiro tanto no Brasil quanto fora dele. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha orientadora e amiga Norma, obrigada por me conduzir pelo meio acadêmico e científico desde a iniciação científica até o doutorado. Obrigada também por me incentivar a expandir meus horizontes ao concorrer a uma bolsa de estudos no exterior.

À Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UFRRJ e aos membros da secretaria do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) pela ajuda com os documentos e burocracia.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF) por todo conhecimento compartilhado durante as aulas, seminários, qualificações e conversas de corredor.

Ao Mauro, obrigada por me orientar durante o período do doutorado sanduíche, por me acolher em seu laboratório e por acreditar nesse projeto tão fascinante e de igual difícil logística.

A todos os membros do Laboratório Costa-Furtado, pela ajuda nos experimentos do dia-a-dia, pelas dicas e conselhos.

À Nadia, Milena, Olivia, Elvira e todos os membros do Laboratório Rosenthal, por todo o auxílio com conhecimento científico, técnico e/ou financeiro.

A todos da equipe do biotério e da equipe veterinária do *The Jackson Laboratory* que me auxiliaram no manejo e na promoção do bem-estar das colônias.

Às equipes de treinamento, de fisiologia *in vivo* e de sequenciamento de nova geração, pelo auxílio na experimentação animal e nos experimentos de biologia molecular.

Aos camundongos que foram utilizados para a confecção deste projeto, minha eterna gratidão.

E nessa reta final, agradeço em especial aos membros da banca, por aceitarem o convite e pelas valiosas contribuições que com certeza somaram imensamente em melhorar a qualidade deste trabalho.

Além de todos os esforços institucionais e burocráticos, nada seria possível sem uma rede invisível de suporte emocional, na qual eu descanso e me alimento diariamente.

Agradeço à minha mãe Marinalva, irmã Suzane, tias Preta e Fátima, primas Jéssica, Poliane, Gisele, avó Nevinha e aos demais familiares próximos por todo o amor e apoio. Obrigada por se fazerem presentes mesmo quando 8000 quilômetros nos separavam. Vocês são parte de mim, e essa realização é nossa.

À Nati, Jacque, Bia, Bela e aos demais amigos de longa data, obrigada por nutrir minhas raízes com mensagens de suporte, pelos ouvidos e coração abertos e por toda compreensão.

À Debs, Edu, Matheus e Marlon pela surpreendente conexão e por momentos onde o tempo de amizade se mostrou inversamente proporcional ao grau de empatia, aceitação e amor compartilhados.

À Sbonga, Elvira e Olivia, por acolherem-me com tanto cuidado, por tantos conselhos e momentos que nunca vou esquecer.

À Donna, Eillen, Amy, Mary e Max, pelo suporte cuidadoso e atento, igualmente profissional e humano, nos meus momentos mais desafiadores.

À Heidi, Christine, Chihiro, Isabela, Logan, Nurteen, Neha, Abby, Ambrey e a todas as pessoas incríveis que eu tive a sorte de encontrar no frio e isolamento de Bar Harbor.

Enfim, a cada pessoa que cruzou meu caminho: obrigada por me mostrarem que cada indivíduo é único e perfeito da forma que é e que as diferenças devem ser celebradas, respeitadas e reverenciadas a todos os momentos.



“Ser forte não significa exercitar os músculos. Significa encontrar seu próprio brilho sem fugir, vivendo ativamente com a natureza selvagem de uma maneira própria. Significa ser capaz de aprender, ser capaz de defender o que sabemos. Significa se manter e viver”.

Clarissa Pinkola Estés

## RESUMO

ZECA, Suelen Guedes. **Estudo da transmissão inter- e transgeracional de alterações metabólicas, comportamentais e cardíacas na prole de camundongos obesos por duas gerações consecutivas.** 2020. 99 p. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Dados epidemiológicos e experimentais demonstram que a obesidade materna é capaz de transmitir distúrbios metabólicos, comportamentais e cardiovasculares na prole, transmitidas potencialmente de forma epigenética. Trabalhos mais recentes indicam a participação da obesidade paterna no desenvolvimento de alterações na composição corporal e distúrbios metabólicos através de alterações epigenéticas no espermatozóide. Pouco ainda é conhecido sobre esse fenômeno em mamíferos, e no dimorfismo da programação metabólica nesses modelos. O objetivo deste trabalho foi compreender se a obesidade materna ou paterna, separadamente, modula o metabolismo, comportamento, e função cardíaca em roedores, por duas gerações consecutivas. Camundongos C57BL/6J fêmeas ou machos alimentaram-se com dieta controle (NC, 6% de lipídeos) ou hiperlipídicas (HF45 e HF60, 45 e 60% de lipídeos, respectivamente) *ad libitum* por seis semanas antes da avaliação da composição corporal, metabolismo glicídico e comportamental. Os grupos maternos e paternos NC, HF45 e HF60, considerados geração F0, foram acasalados com animais NC do sexo oposto para obtenção da geração F1. Para aumentar a influência da programação, a geração F2 foi obtida pelo cruzamento de camundongos F1 dentro de seu próprio grupo. Excetuando-se F0, todos os animais foram mantidos em NC durante todo o período. Observamos que fêmeas e machos F0-HF45 e F0-HF60 apresentaram maior peso corporal e adiposidade (fêmeas:  $p < 0,01$ ; machos:  $p < 0,001$ ) e prejuízo no metabolismo glicídico ( $p < 0,05$ ). Nas fêmeas, nenhuma diferença significativa foi observada nas taxas de gravidez e número de filhotes ao nascimento; porém fêmeas F0-HF60 apresentaram menor taxa de sobrevivência dos filhotes após o desmame ( $p < 0,05$ ). A obesidade materna afetou em maior proporção os filhotes machos MHF45, que na F1 apresentaram maior massa corporal ( $p < 0,001$ ), adiposidade ( $p < 0,001$ ) e prejuízo no metabolismo glicídico ( $p < 0,05$ ) e, na F2 apresentaram menor peso corporal ( $p < 0,05$ ) e alterações cardíacas representadas pela redução na fração de ejeção ( $p < 0,05$ ) e aumento no volume sistólico final do ventrículo esquerdo ( $p < 0,05$ ). A obesidade paterna afetou filhotes machos e fêmeas em proporções semelhantes. Observamos maior massa corporal ( $p < 0,05$ ) e adiposidade ( $p < 0,05$ ) em ambos sexos na prole F1-PHF45 e nos machos F1-PHF60. Na F2 observamos menor peso corporal na prole PHF45 ( $p < 0,05$ ), com menor adiposidade nas fêmeas F2-PHF45 ( $p < 0,01$ ), sem alteração no metabolismo glicídico nas duas gerações. A função cardíaca apresentava-se normal na F1, mas uma redução substancial na fração de ejeção e aumento do volume sistólico final do VE foi detectado nas proles F2-PHF45, em machos ( $p < 0,05$ ) e fêmeas ( $p < 0,01$ ). Dessa forma, concluímos que os filhotes machos foram mais afetados pela obesidade materna, enquanto alterações na obesidade paterna foram observadas em ambos os sexos, principalmente em relação aos prejuízos na função cardíaca. Tal dimorfismo mostra a importância do estudo em ambos os sexos, bem como a necessidade de estudos adicionais para a busca de marcadores epigenéticos chaves na manutenção e transmissão destes fenótipos às proles subsequentes.

**Palavras-chaves:** ecocardiograma, epigenética, obesidade materna e paterna.

## ABSTRACT

ZECA, Suelen Guedes. **Studying inter- and transgenerational transmission of metabolic, behavioral, and heart phenotypes on mice offspring for two consecutive generations.** 2020. 99 p. Thesis (Ph.D. in Physiological Sciences). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Epidemiological and experimental data show that maternal obesity can transmit metabolic, behavioral, and cardiovascular diseases, potentially transmitted by epigenetic mechanisms. Recent literature indicates paternal obesity's role in developing body composition and metabolic diseases by epigenetic modifications on spermatic cells. There is a lack of information about the phenomena in mammals and the dimorphic aspect of this experimental model's metabolic programming. This research aimed to understand if maternal or paternal obesity, separately, modulate the metabolism, behavior, and cardiac function in rodents, for two subsequent generations. Male and female C57BL/6J mice were fed with chow (NC, 6% lipids) or high fat (HF45 and HF60, 45 and 60% lipids, respectively) diet *ad libitum* for six weeks prior body composition, glyceimic metabolism, and behavioral evaluation. Maternal and paternal NC, HF45, and HF60 groups, the F0 generation, were mated with NC animals to obtain F1. To boost the programming effects, the F2 generation was obtained by crossing the F1 generation within their groups. We kept all animals in a chow diet during the experimental protocol, except F0. We observed that F0-HF45 and F0-HF60 male and female had higher body weight and adiposity (female:  $p < 0.01$ ; male:  $p < 0.001$ ) and glyceimic metabolism impairment ( $p < 0.05$ ). No significant changes were observed on females regarding pregnancy rate and litter number at birth; however, F0-HF60 females had decreased pups by the end of lactation ( $p < 0.05$ ). Maternal obesity had a more significant impact on MHF45 male offspring, in which F1 had increased body weight ( $p < 0.001$ ), adiposity ( $p < 0.001$ ), and impaired glyceimic metabolism ( $p < 0.05$ ). On F2 generation, it was observed not only reduced body weight in this group ( $p < 0.05$ ), but also cardiac defects, showed by decreased ejection fraction ( $p < 0.05$ ) and increased left-ventricle (LV) end-systolic volume ( $p < 0.05$ ). Paternal obesity affected male and female offspring in similar proportions. We observed more significant body weight ( $p < 0.05$ ) and adiposity ( $p < 0.05$ ) in both sexes in the F1-PHF45 group and F1-PHF60 males. On F2 generation, decreased body weight was observed in male and female F2-PHF45 ( $p < 0.05$ ), as well as reduced adiposity in female F2-PHF45 ( $p < 0.01$ ), without changes in glyceimic metabolism in both generations. The cardiac function was normal on F1, but a substantial reduction in the ejection fraction and increased left-ventricle (LV) end-systolic volume were detected on F2-PHF45 groups, male ( $p < 0.05$ ) and female ( $p < 0.01$ ). Therefore, we suggest that male offspring was more affected by maternal obesity, while paternal obesity affects both sexes in similar ways, especially regarding the cardiac function. Such dimorphism shows the importance of both sex's studies and the need for additional research on key epigenetic markers regarding phenotype maintenance and transmission to subsequent generations.

**Keywords:** echocardiogram, epigenetic, maternal, and paternal obesity.

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Informações nutricionais sobre as dietas utilizadas no modelo experimental.....	24
--	----

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Esquemática de alguns dos principais processos na fisiopatologia da obesidade.....	10
<b>Figura 2:</b> Diagrama que indica a complexa relação entre fatores genéticos e do meio ambiente que culminam em alterações no padrão de metilação do DNA observadas em indivíduos obesos.....	19
<b>Figura 3:</b> Desenho experimental do modelo de obesidade induzida por dieta.....	23
<b>Figura 4:</b> Desenho experimental do modelo de obesidade materna induzida por dieta.....	26
<b>Figura 5:</b> Desenho experimental do modelo de obesidade paterna induzida por dieta.....	27
<b>Figura 6:</b> Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos fêmeas, após 6 semanas de fornecimento de dietas hiperlipídicas.....	33
<b>Figura 7:</b> Avaliação comportamental obtida através do teste de campo aberto, em fêmeas de 10 semanas de idade.....	34
<b>Figura 8:</b> Parâmetros observados nas matrizes durante a gestação e lactação dos filhotes.....	35
<b>Figura 9:</b> Análise da evolução da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta.....	37
<b>Figura 10:</b> Análise da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta na 25ª semana de idade.....	38
<b>Figura 11:</b> Análise da tolerância a glicose intraperitoneal de filhotes machos (laranja) e fêmeas (rosa) da primeira geração (F1) de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, nas idades de 6, 10, 15 e 25 semanas.....	39

<b>Figura 12:</b> Análise da tolerância a glicose intraperitoneal de filhotes machos (laranja) e fêmeas (rosa) da segunda geração (F2) de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, nas idades de 6, 10, 15 e 25 semanas.....	40
<b>Figura 13:</b> Análise comportamental da prole macho (laranja) e fêmea (rosa) de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta na 15ª semana de idade, através do teste de campo aberto, por duas gerações subseqüentes.....	41
<b>Figura 14:</b> Análise da função cardíaca de filhotes machos (laranja) e fêmeas (rosa) provenientes de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25ª semana de idade, das proles F1 e F2.....	42
<b>Figura 15:</b> Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos machos, após 6 semanas de fornecimento de dieta hiperlipídica.....	44
<b>Figura 16:</b> Análise comportamental de camundongos machos submetidos ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta antes do acasalamento.....	45
<b>Figura 17:</b> Análise da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as idades de 6, 10 e 15 semanas.....	47
<b>Figura 18:</b> Análise da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta na 25ª semana de idade.....	48
<b>Figura 19:</b> Análise da evolução do metabolismo da glicose de filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) da primeira geração (F1) de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta ao longo do experimento.....	49
<b>Figura 20:</b> Análise da evolução do metabolismo da glicose filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) da segunda geração (F2) de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, ao longo do experimento.....	50

**Figura 21:** Análise comportamental da prole macho (verde) e fêmea (azul) de camundongos machos submetidos ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta na 15ª semana de idade, através do teste de campo aberto, por duas gerações subsequentes.....52

**Figura 22:** Análise da função cardíaca de filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) provenientes de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25ª semana de idade, das gerações F1 e F2.....53

## LISTA DE ABREVIACOES

AdipoR: receptor de adiponectina

AGT: angiotensinogenio

AMPK: do inglês, *5' AMP-activated protein kinase*

ANOVA: análise de variância

Apoa4: apolipoproteína A4

AT: receptores de angitensina

AUC: rea abaixo da curva

AVC: acidente vascular cerebral

BDNF: do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*

CA: campo aberto

CAP-1: proteína associada da adenilato ciclase 1

DMV: núcleo dorsal motor do vago

DNA: cido desoxirribonucleico

DNAc: cido desoxirribonucleico complementar

DOHaD: do inglês, *developmental origins of health and disease*

ECA: enzima conversora de angiotensina

ECO: ecocardiograma

ET-1: endotelina-1

EUT: eutanásia

g: gramas

GWAS: do inglês, *genome-wide association studies*

HDL: lipoproteína de alta densidade

HF45: dieta hiperlipídica de 45% de lipídeos

HF60: dieta hiperlipídica de 60% de lipídeos

HFD: dieta hiperlipídica; do inglês, *high-fat diet*

HFD-n6: dieta hiperlipídica com ácidos graxos poli-insaturados do tipo mega-6

HFD-sat: dieta hiperlipídica com gordura saturada



HIF1: do inglês, *hypoxia inducible factor*

IFN- $\gamma$ : interferon gama

IL-6: interleucina 6

IMC: índice de massa corporal

IR: receptor de insulina

IRS-1: substrato 1 do receptor de insulina

JNK1: quinase c-Jun N-terminal tipo 1

LDL: lipoproteína de baixa densidade

LPS: lipopolissacarídeos

MCP-1: proteína quimioatrativa de monócitos-1

MHF45: prole advinda do grupo materno em HF45

MHF60: prole advinda do grupo materno em HF60

mmHg: milímetros de mercúrio

NC: dieta controle

NF- $\kappa$ B: fator nuclear kappa B

NO: óxido nítrico

ObR: receptor da leptina

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAR: do inglês, *predictive adaptive responses*

PHF45: prole advinda do grupo paterno em HF45

PHF60: prole advinda do grupo paterno em HF60

PPAR: do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*

PRC: proteína reativa C

PRC2: do inglês, *polycomb repressive complex 2*

RMN: ressonância magnética nuclear

RNA: ácido ribonucleico

RNA<sub>m</sub>: ácido ribonucleico mensageiro

RNAseq: RNA sequencial

SEM: erro padrão da média

SMet: síndrome metabólica

SNC: sistema nervoso central

SNPs: polimorfismo de nucleotídeo único

SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona

TG: triglicerídeo

TLR: receptores tipo toll

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa

TTG: tolerância intraperitoneal a glicose

VE: ventrículo esquerdo

VLDL: lipoproteína de muito baixa densidade

VMH: núcleo hipotalâmico ventro-medial

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1.    Obesidade: cenário atual no Brasil e no mundo, causas e consequências.....	3
2.2.    Fisiopatologia da obesidade.....	4
2.2.1. Alterações inflamatórias.....	5
2.2.2. Alterações hormonais.....	6
2.2.3. Obesidade na síndrome metabólica.....	11
2.3.    Programação fetal: definições e consequências da obesidade parental.....	12
2.3.1. Obesidade materna.....	13
2.3.2. Obesidade paterna.....	15
2.3.3. Herança epigenética e suas possibilidades.....	17
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1.    Objetivo Geral.....	21
3.2.    Objetivos Específicos.....	21
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1.    Animais.....	22
4.2.    Desenho experimental.....	22
4.3.    Análise da composição corporal.....	28
4.4.    Análise da tolerância a administração intraperitoneal de glicose.....	29
4.5.    Análise comportamental.....	29
4.6.    Análise da função cardíaca.....	30
4.7.    Análise estatística.....	31

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
5.1. Análise metabólica e comportamental das fêmeas F0 antes do acasalamento.....	32
5.1.1. Análise metabólica.....	32
5.1.2. Análise comportamental.....	34
5.2. Análise metabólica, comportamental e cardíaca da prole de fêmeas obesas.....	36
5.2.1. Análise metabólica.....	36
5.2.2. Análise comportamental.....	41
5.2.3. Análise da função cardíaca.....	42
5.3. Análise metabólica e comportamental dos machos F0 antes do acasalamento.....	43
5.3.1. Análise metabólica.....	43
5.3.2. Análise comportamental.....	45
5.4. Análise metabólica, comportamental e cardíaca da prole dos machos obesos.....	46
5.4.1. Análise metabólica.....	46
5.4.2. Análise comportamental.....	51
5.4.3. Análise da função cardíaca.....	52
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>54</b>
<b>7. CONCLUSÕES.....</b>	<b>64</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>65</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
ANEXO A.....	90
ANEXO B.....	95

## 1. INTRODUÇÃO

Sobrepeso e obesidade são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de gordura corporal que oferecem risco à saúde do indivíduo. Mudanças sócio-econômicas e na indústria alimentícia que ocorreram no período pós-Segunda Guerra Mundial favoreceram a oferta e consumo de alimentos processados altamente calóricos em detrimento à alimentação de produtos *in natura*. Tal fato culminou nos altos índices de obesidade e sobrepeso atuais, assim como aumento na ocorrência de co-morbidades associadas, dentre elas: diabetes do tipo 2, síndrome metabólica e dislipidemias, depressão e enxaquecas, doenças cardíacas e hipertensão arterial. Além dos prejuízos causados ao próprio indivíduo, evidências apontam que a obesidade pode ter efeitos a longo prazo na descendência.

A teoria da DOHaD (sigla em inglês, que significa: origens do desenvolvimento da saúde e doença) estuda precisamente como insultos ambientais, hormonais ou nutricionais durante as fases iniciais de desenvolvimento do indivíduo podem levar à programação metabólica e ao surgimento de doenças crônicas na vida adulta. As fases iniciais mais estudadas compreendem os períodos de concepção e desenvolvimento do zigoto, implantação, gestação e lactação, sendo consideradas de extrema importância devido ao intenso crescimento, replicação e diferenciação celular que ocorre nestes períodos mencionados.

Os mecanismos pelos quais ocorrem a programação metabólica têm sido em parte explicados pela herança epigenética transgeracional, ramo da epigenética onde estuda-se alterações nos padrões de expressão gênica que são herdados através das gerações, sem que haja mudanças na sequência de bases do DNA. Tais padrões e marcadores epigenéticos podem ocorrer a nível nuclear (como modificações do estado da cromatina, metilação do DNA ou alterações de histonas), citoplasmático (como a expressão de microRNAs ou outros RNAs não-codificantes) ou serem dependentes das interações célula-célula e dessas com o ambiente (como dietas e exercício físico). A noção de que genética, epigenética e meio ambiente se interligam para o aparecimento e desenvolvimento dos mais diversos fenótipos é intrigante, e mostra a importância de abordagens multifacetadas para a compreensão de fatores que equilibram os estados de saúde e doença nos organismos.

Nesse contexto, dados na literatura sugerem que a obesidade e o sobrepeso materno são associados ao aumento do risco de complicações obstétricas e doenças na prole, desde mal-formações congênitas a doenças crônicas na fase adulta. Dentre estas, citamos: disfunções metabólicas, obesidade, autismo, depressão, ansiedade e doenças cardiovasculares. Tais doenças podem ser expressas de forma diferente entre a prole macho e fêmea, além de ter capacidade de transmissão para mais de uma geração, caso haja *imprint* dos distúrbios observados.

Além da programação através do lado materno, estudos epidemiológicos recentes indicam que a obesidade paterna também influencia marcadores epigenéticos, submetendo a prole ao maior risco de desenvolvimento da obesidade e resistência insulínica, por exemplo. Modelos experimentais em invertebrados sugerem que o consumo paterno de dietas hipercalóricas, sejam estas ricas em açúcares e/ou gorduras, promovem a transmissão intergeracional de alterações metabólicas em filhotes machos e fêmeas por mudanças no padrão de marcadores epigenéticos nos espermatozoides de animais obesos. No entanto,

pouco se sabe acerca da transmissão transgeracional da doença cardíaca em mamíferos, ou de aspectos dimórficos no padrão desta transmissão no contexto da obesidade paterna.

No presente trabalho, estudamos as consequências metabólicas e comportamentais diretas do consumo de dietas ricas em lipídeos, bem como a transmissão de características metabólicas, comportamentais e cardíacas em duas gerações subsequentes de camundongos, tanto pela linhagem feminina quanto pela masculina. Sabe-se que mecanismos epigenéticos são fundamentais desde a união das células germinativas e diferenciação celular, permanecendo ativos e passíveis de modulação por toda a vida do indivíduo. Por essa razão, além de avaliar a existência de dimorfismo sexual, pesquisas científicas como esta visam, fundamentalmente, prover indícios e substrato para o desenvolvimento de estratégias para o tratamento e prevenção dos possíveis distúrbios que a obesidade parental (materna ou paterna) possa ocasionar.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Obesidade: cenário atual no Brasil e no mundo, causas e consequências

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os termos obesidade e sobrepeso são definidos como acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo branco, gerando risco para a saúde de um determinado indivíduo. De 1980 aos dias atuais, a obesidade triplicou na população mundial, caracterizando um alarmante *status* pandêmico (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019).

O último levantamento feito pela OMS, em 2016, mostrou que mais de 1,9 bilhões de adultos encontravam-se com sobrepeso no mundo. Destes indivíduos, mais de 650 milhões eram obesos, totalizando 13% da população mundial. Em relação às crianças e adolescentes de cinco a dezenove anos, mais de 340 milhões estavam em sobrepeso ou obesidade e, em crianças menores de cinco anos, o número foi de 41 milhões, fazendo desta geração a primeira a possuir menor expectativa de vida do que seus pais (INTERNATIONAL OBESITY TASKFORCE, 2019; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2020).

Tais estatísticas são refletidas também no Brasil. GOMES e colaboradores (2019) demonstraram que a prevalência da obesidade aumentou de 7,5 para 17% de 2002 a 2013 entre jovens adultos (20 a 39 anos), e de 14,7 para 25,7% entre adultos entre 40 a 59 anos (GOMES *et al.*, 2019). O último levantamento epidemiológico brasileiro foi realizado pela VIGITEL, uma organização que faz a vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico. De acordo com esse estudo, no conjunto das 27 cidades, a frequência de adultos obesos foi de 20,3%, sendo semelhante entre homens e mulheres. (VIGITEL, 2020).

Por ser uma doença complexa, o aumento dos casos de obesidade tem origem multifatorial intimamente relacionada à intricada interação entre fatores sociais, ambientais, genéticos, de estilo de vida, culturais e outros (CHALK, 2004). No Brasil, estudos epidemiológicos demonstraram que a idade avançada, o nível de instrução baixo, menor atividade física e menor ingestão de frutas e hortaliças são considerados também fatores de risco à obesidade (GOMES *et al.*, 2019; FERREIRA *et al.*, 2019, VIGITEL, 2020).

A globalização unificou o mundo, permitindo o comércio entre nações. Tal acontecimento foi marcado por intensas mudanças socioeconômicas e na indústria alimentícia que favoreceu o aumento da oferta e consumo de alimentos processados altamente calóricos, além da redução da atividade física da população (GRUNDY, 2005). Por conta da instituição de um ambiente altamente obesogênico, alguns pesquisadores definem a globalização como o fator mais significativo para o aumento dos índices globais de obesidade e sobrepeso. Tal teoria é conhecida como teoria *globesity* (uma junção dos termos *globalization* e *obesity*, em inglês) e discorre não somente sobre as causas, mas também sobre as consequências na saúde de indivíduos com obesidade e sobrepeso (GRUNDY, 2002; BELL *et al.*, 2005, COSTA-FONT & MAS, 2016).

De fato, sabe-se que a obesidade é um fator de risco para diversas doenças crônicas não-comunicáveis, consideradas desafios para os sistemas de saúde global e brasileiro. Cerca

de 72% de todas as mortes no Brasil são atribuídas a doenças não-comunicáveis (SCHMIDT & DUNCAN, 2011), sendo grupos de baixa renda ocupando grande parte dessa população (BERNAL *et al.*, 2016). Dentre as doenças mais prevalentes em indivíduos obesos ou com sobrepeso, observamos diabetes e dislipidemias, problemas na saúde mental, hipertensão, doenças cardíacas e alguns tipos de câncer (HRUBY & HU, 2015). Além dessas doenças, a obesidade aumenta o risco de severidade dos sintomas da infecção pelo SARS-CoV-2, o COVID-19, visto que a obesidade está associada a uma redução da capacidade imunológica (TANAKA *et al.*, 2001; ALWARAWRAH *et al.*, 2018) e da capacidade respiratória de reserva, dificultando a ventilação pulmonar (SIMONNET *et al.*, 2020; TARTOF, *et al.*, 2020). O aumento da morbidade em pessoas obesas ou com sobrepeso, portanto, só reforçam a importância da implementação de políticas públicas para a prevenção da obesidade e da conscientização da necessidade de hábitos saudáveis na sociedade brasileira (FERREIRA *et al.*, 2019).

## 2.2. Fisiopatologia da obesidade

Além de sua conhecida função como reserva energética, o tecido adiposo participa ativamente em outros processos fisiológicos. Os tecidos adiposos foram inicialmente subdivididos de acordo com sua aparência anatômica, pois foram observados que possuem colorações branca e amarronzada. Posteriormente, tais diferenças foram observadas também a nível molecular e fisiológico e, atualmente sabemos que tais tecidos possuem, além das distintas posições e colorações anatômicas, composição celular e repertório secretório específico a sua função correspondente (CHAIT & HARTIGH, 2020).

Ao contrário do que se pensava antigamente, tal diferenciação ocorre durante a diferenciação de células progenitoras e, embora ambas células tenham origem mesenquimal, o adipócito marrom e o músculo esquelético compartilham o mesmo precursor (Myf5+), enquanto o branco é Myf5-. No entanto, adipócitos brancos podem ser transformados em adipócitos marrom-like, os chamados adipócitos bege, através da exposição ao frio, a agonistas  $\beta$ -adrenérgicos ou a agonistas do PPAR- $\gamma$  (PARK *et al.*, 2014).

Em relação ao tecido adiposo marrom, sua função principal é a de transferir a energia armazenada, advinda da alimentação, em calor, sob controle majoritário da liberação de norepinefrina liberada de terminações nervosas do sistema simpático (CANNON & NEDERGAARD, 2004). O tecido adiposo branco, por sua vez, está mais relacionado à reservatório energético e importante ação secretora. É composto por inúmeros tipos celulares que secretam de forma coordenada citocinas, quimiocinas e hormônios que possuem papel fundamental na homeostase energética, principalmente em processos de metabolização lipídica e glicídica (CRISTANCHO & LAZAR, 2011). Somente um terço das células que compõe o tecido adiposo branco é formado por adipócitos; o restante é representado por fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, células estromais, células imunológicas e pré-adipócitos (CHAIT & HARTIGH, 2020). A seguir, analisaremos de forma mais detalhada as alterações inflamatórias que ocorrem comumente em indivíduos obesos, por aumento dos reservatórios de tecido adiposo branco.



### 2.2.1. Alterações inflamatórias

Indivíduos obesos têm aumento na massa adiposa que frequentemente apresenta-se em processo inflamatório moderado e crônico, que pode levar ao remodelamento e disfunção do tecido (LUMENG *et al.*, 2007). Por estímulos ainda não totalmente compreendidos, há a ativação de linfócitos Th1 (citotóxico, CD8<sup>+</sup>) no tecido adiposo, que por sua vez propaga o processo inflamatório, incluindo o recrutamento de monócitos e macrófagos no tecido adiposo de obesos e suas subseqüentes diferenciação e ativação local (NISHIMURA *et al.*, 2009).

De acordo com o estado de ativação e funções dos macrófagos, estes podem ser divididos em dois grupos. No tecido adiposo, macrófagos dos tipos M1 e M2 compõe cerca de 10% da fração estromal do órgão em indivíduos saudáveis (FANTUZZI, 2005). A liberação de interferon gama (IFN- $\gamma$ ), produzida pelos linfócitos Th1 leva ao desequilíbrio entre as duas populações de macrófagos ao aumentar a ativação de macrófagos do subtipo M1 (CURAT *et al.*, 2006; SALTIEL & OLEFSKY, 2017). Ao contrário dos macrófagos ativados do tipo M2, estas células têm o papel de apresentar antígenos, secretar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, sendo seus principais produtos o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6). Todos estes fatores já foram relacionados ao desenvolvimento de resistência insulínica e doenças metabólicas (LUMENG *et al.*, 2007; SALTIEL & OLEFSKY, 2017). Além do tecido adiposo, o aumento de marcadores inflamatórios também ocorre no epitélio intestinal (MCLAUGHLIN *et al.*, 2017), nas ilhotas pancreáticas (EGUCHI & NAGIA, 2017), fígado (PARK *et al.*, 2010) e músculo esquelético (WU & BALLANTYNE, 2017), contribuindo no estabelecimento de um ambiente pró-inflamatório que contribui para o desenvolvimento de enfermidades metabólicas, como a resistência insulínica e a diabetes do tipo 2, e cardiovasculares (CRISTANCHO & LAZAR, 2011; CHAIT & HARTIGH, 2020), conforme esquematizado na Figura 1.

O que desencadeia o processo inflamatório associado à obesidade ainda é pouco entendido. Em momentos iniciais da obesidade, há o desacoplamento da respiração mitocondrial nos adipócitos e menor perfusão relativa, visto que este órgão é rapidamente expandido, de forma que a hipóxia parece ser um mecanismo fundamental no estabelecimento da inflamação. Há aumento na demanda de oxigênio e a temporária hipóxia celular pode iniciar o processo inflamatório possivelmente através da ativação da via HIF1 (do inglês, *hypoxia inducible factor*), visto que a deleção genética do HIF1 em adipócitos previne a inflamação induzida pela obesidade e a resistência insulínica (LEE *et al.*, 2014a).

Alguns pesquisadores acreditam que as dietas têm papel importante, visto que diferentes espécies de lipídeos podem promover inflamação pela ligação indireta com receptores tipo *tool* (TLR) subtipos TLR4 e TLR2 através da proteína fetuina A, resultando em ativação das vias NF- $\kappa$ B (fator nuclear *kappa* B) e JNK1 (quinase c-Jun N-terminal tipo 1) (SHI *et al.*, 2006). Uma vez ativadas, essas vias de sinalização aumentam a síntese e secreção de quimiocinas, como a proteína quimioatrativa de monócitos-1 (MCP-1) em adipócitos ou hepatócitos levando à infiltração de macrófagos pró-inflamatórios. Ao mesmo tempo, lipídeos das famílias ômega-3 e ômega-6 participam em processos anti-inflamatórios (OH & OLEFSKY, 2012).

Além disso, há aumento da permeabilidade intestinal em indivíduos obesos, o que resulta em maior concentração sérica de lipopolissacarídeos (LPS) originários de bactérias

gram-positivas intestinais (AMAR *et al.*, 2011). No tecido adiposo, o LPS inicia uma cascata inflamatória via ativação de TLR4, semelhante ao que ocorre no fígado. Consistente com essa teoria, aumento sérico de LPS tem sido positivamente correlacionado com diabetes tipo 2 em humanos (SHI *et al.*, 2006).

Evidências também demonstram que a inflamação crônica na obesidade não se limita apenas ao tecido adiposo, mas é capaz de atravessar a barreira encefálica. Essa resposta inflamatória pode ser originada pelo recrutamento de células imunológicas periféricas, como macrófagos e células B ao sistema nervoso central (SNC) (BUCKMAN *et al.*, 2014). Regiões cerebrais que regulam a homeostase energética e o metabolismo sistêmico são particularmente mais afetadas. O consumo de dietas hiperlipídicas e/ou hipercalóricas é capaz de induzir processos inflamatórios no hipotálamo antes do que tecidos periféricos e diversas células neuronais ou não-neuronais que participam desse processo (JAIS & BRUNING, 2017).

Grande parte dos marcadores inflamatórios mencionados anteriormente são relacionados à incidência da síndrome metabólica. Dentre os mais importantes estão a IL-6 (HEINRICH *et al.*, 1990), proteína amiloide A e moléculas de adesão solúveis (KOH *et al.*, 2005; KRESSEL *et al.*, 2009). Além destas, temos também a proteína reativa C (PRC), que se relaciona positivamente com o grau de severidade e prognóstico da síndrome metabólica (YUDKIN *et al.*, 1999; AHLUWALIA *et al.*, 2012; RODRIGUEZ\_HERNANDEZ *et al.*, 2013).

### **2.2.2. Alterações hormonais**

O tecido adiposo branco tem papel extremamente relevante na secreção hormonal do organismo, sendo considerado para alguns pesquisadores como o maior tecido endócrino do corpo humano (AHIMA & FLIER, 2000; COELHO *et al.*, 2013). Sua natureza pleiotrópica é baseada na habilidade que os adipócitos possuem de secretar hormônios, fatores de crescimento, enzimas, citocinas, fatores do sistema complemento e proteínas da matriz celular. Além disso, adipócitos também possuem receptores para a maioria desses fatores, diretamente relacionados à regulação de processos de consumo alimentar, gasto energético, homeostase energética, imunidade e controle da pressão arterial (COSTA & DUARTE, 2006; MATSUZAWA, 2006). Os hormônios leptina, angiotensina, adiponectina e resistina produzidos pelo tecido adiposo, bem como seus principais efeitos metabólicos, serão comentados a seguir e ilustrados resumidamente na Figura 1.

A leptina é uma proteína de 16 kDa, 167 resíduos de aminoácidos e foi identificada em 1995 como produto do gene *ob*, em camundongos (FRIEDMAN, 2009). O receptor da leptina (ObR) foi identificado como um receptor da família da classe I das citocinas, expresso em vários núcleos cerebrais e tecidos periféricos (TARTAGLIA *et al.*, 1995). Sua ação central clássica ocorre no núcleo arqueado hipotalâmico (XU *et al.*, 2011a), estimulando a expressão de fatores anorexigênicos, enquanto inibe a expressão de fatores orexigênicos, garantindo assim a redução do consumo alimentar e o aumento do gasto energético (LIMA & CURI, 2012).

Além disso, a leptina também age em neurônios localizados no núcleo hipotalâmico ventro-medial (VMH), estimulando o aumento da ação do sistema nervoso simpático no organismo (SATO *et al.*, 1999). A leptina também influencia a atividade parassimpática, inibindo-a de forma (1) direta: a interação deste hormônio sobre o receptor ObR-b leva à hiperpolarização dos neurônios no núcleo dorsal motor do vago (DMV) (WILLIAMS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2007); (2) e indireta, por ação estimulatória em neurônios glutamatérgicos do núcleo do trato solitário, que realizam sinapses inibitórias com neurônios no DMV (WILLIAMS *et al.*, 2007).

No sistema cardiovascular, a leptina é capaz de induzir proliferação, diferenciação e ativação de células hematopoiéticas (GAINSFORD *et al.*, 1996), promover angiogênese (BOULOUMIÉ *et al.*, 1998; SIERRA-HONIGMANN *et al.*, 1998), além de aumentar respostas pró-inflamatórias (LOFFREDA *et al.*, 1998) e prejudicar a função endotelial por aumentar a degradação de óxido nítrico (NO) (FORTUÑO *et al.*, 2010). A leptina também estimula a produção de endotelina-1 (ET-1) (JUAN *et al.*, 2008), e o excesso do hormônio promove calcificação vascular (LIU *et al.*, 2014; PARHAMI *et al.*, 2001), agregação plaquetária e trombose arterial (KONSTANTINIDES *et al.*, 2006). O aumento sérico nos níveis de leptina promove o estresse oxidativo sistêmico e intrarrenal, reduz a bioatividade do NO, reduz a natriurese ao aumentar a reabsorção de sódio através da suprarregulação da bomba Na/K-ATPase na medula renal (BELTOWSKI *et al.*, 2004; KONUKOGLU *et al.*, 2006), diminui a vasodilatação dependente do endotélio (KUNDSON *et al.*, 2008) e potencializa os efeitos da angiotensina II na pressão arterial (WANG *et al.*, 2013).

A ativação simpática no coração leva à fosforilação de proteínas que aumentam a força de contração, a velocidade de relaxamento e a frequência cardíaca (ZHAO *et al.*, 1994; SIMMERMAN & JONES, 1998; XIAO, 2000), além de aumentar o risco de hipertensão arterial (BRAVO *et al.*, 2006). Em modelos experimentais *in vitro*, a leptina é capaz de promover hiperplasia (TAJMIR *et al.*, 2004) e hipertrofia cardíaca (RAJAPUROHITAM *et al.*, 2003, 2006). *In vivo*, a hipertrofia teve correlação direta com a suprarregulação do receptor ObR-b (MATSUI *et al.*, 2012) e fibrose cardíaca ao induzir a produção de colágeno via aumento no estresse oxidativo (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2014).

Diversos componentes do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), como o angiotensinogênio (AGT), renina, enzima conversora de angiotensina (ECA) e os receptores de angiotensina (AT) das isoformas 1 e 2, já foram localizados no tecido adiposo de roedores e camundongos (AHIMA & FLIER, 2000; CASSIS, 2000).

Em humanos, a expressão de angiotensinogênio tem sido demonstrada no tecido adiposo, em cultivo de células primárias de adipócitos e em pré-adipócitos (JONES *et al.*, 1997; ENGELI *et al.*, 1999). De fato, o aumento na expressão e secreção de AGT é uma característica da diferenciação de pré-adipócitos, sendo considerado um marcador tardio para estas células (AUBERT *et al.*, 1997). Estudos *in vitro* indicam que ácidos graxos (SAFONOVA *et al.*, 1997), glicocorticóides (AUBERT *et al.*, 1997) e TNF- $\alpha$  (AUBERT *et al.*, 1998) são capazes de modular a expressão de AGT no tecido adiposo. No entanto, estrógenos, triiodotironina, angiotensina II e a glicose, conhecidamente ativadoras da produção de AGT hepático, não demonstraram esse mesmo efeito em adipócitos (AUBERT *et al.*, 1997; JONES *et al.*, 1997). A expressão do RNAm (ácido ribonucleico mensageiro) do angiotensinogênio e das demais proteínas associadas também são reguladas pela nutrição: há

aumento da síntese dos componentes do SRAA durante o jejum, e redução da expressão proteica quando o jejum é interrompido (ENGELI *et al.*, 1999).

A angiotensina II estimula a síntese de prostaciclina, diferenciação de adipócitos e lipogênese (THATCHER *et al.*, 2009). Outra possibilidade é que os peptídeos secretados pelo tecido adiposo atuam também a nível sistêmico, no sistema vascular e em outros órgãos promovendo controle da pressão arterial e respostas cardiovasculares em indivíduos obesos (DIAMOND, 2002; COELHO *et al.*, 2013).

Em indivíduos com resistência insulínica, a ativação sistêmica do SRAA é crítica para a patogênese da hipertensão e outros componentes da síndrome cardiorenal (DEMARCO *et al.*, 2014). O SRAA no tecido adiposo contribui para a doença sistêmica, visto que produz cerca de 30% do AGT circulante (PADILLA *et al.*, 2015). Por esse motivo, diversos estudos têm focado nos efeitos do bloqueio do SRAA em diferentes modelos experimentais de obesidade. MASSIERA e colaboradores (2001) demonstraram que camundongos *knockout* para o AGT no tecido adiposo não desenvolvem obesidade, resistência insulínica e hipertensão em comparação com camundongos *wild-type* após consumo de dieta hiperlipídica (MASSIERA *et al.*, 2001).

YVAN-CHARVET e colaboradores (2005), por sua vez, utilizaram camundongos *knockout* para o receptor AT2 e observaram que os adipócitos eram menores e em maior quantidade. Após desafio com dieta hiperlipídica, estes eram resistentes ao desenvolvimento de obesidade e intolerância à glicose, além de apresentar maior oxidação lipídica de acordo com testes de calorimetria indireta (YVAN-CHARVET *et al.*, 2005). O bloqueio do receptor AT1 também parece ter efeitos benéficos à saúde, uma vez que a administração de uma substância antagonista a este é capaz de reduzir a concentração plasmática de glicose e melhorar a sensibilidade à insulina de camundongos diabéticos, possivelmente associados ao aumento da captação de glicose pelo tecido adiposo, redução do tamanho dos adipócitos e aumento da expressão do PPAR- $\gamma$  (do inglês, *peroxisome proliferator-activated receptor*) (IWAI *et al.*, 2007). Ambos trabalhos corroboram o conceito que a sinalização da angiotensina II, seja via AT1 ou AT2, pode levar aos efeitos deletérios da obesidade.

Adiponectina é uma adipocina de 30 kDa, descoberta na década de 1990 a partir de uma biblioteca de DNAc (ácido desoxirribonucleico complementar) enriquecida para genes adipócito-específicos, tanto a partir do tecido adiposo total quanto em culturas de adipócitos maduros de camundongos (SCHERER *et al.*, 1995). Essa adipocina também demonstra papel importante no processo de diferenciação de adipócitos (HU *et al.*, 1996) em camundongos e já foi descrita no plasma humano (MAEDA *et al.*, 1996; NAKANO *et al.*, 1996). A adiponectina age através de dois receptores distintos e ubiquamente expressos, conhecidos como AdipoR1, mais abundante no músculo esquelético, e AdipoR2, encontrado em larga escala no fígado (KADOWAKI & YAMAUCHI, 2005).

Sua ação clássica é sobre o metabolismo energético (LEE & SHAO, 2014). No músculo esquelético, promove aumento da sensibilidade à insulina através da AMPK (do inglês, *5' AMP-activated protein kinase*) e PPAR- $\alpha$  (KADOWAKI & YAMAUCHI, 2005; YE & SCHERER, 2013). No fígado, a adiponectina estimula a captação de glicose e inibe a gliconeogênese via AMPK, enquanto promove a oxidação de ácidos graxos e exerce atividade anti-inflamatória via PPAR- $\alpha$  (WU *et al.*, 2003), além de aumentar a sensibilidade insulínica

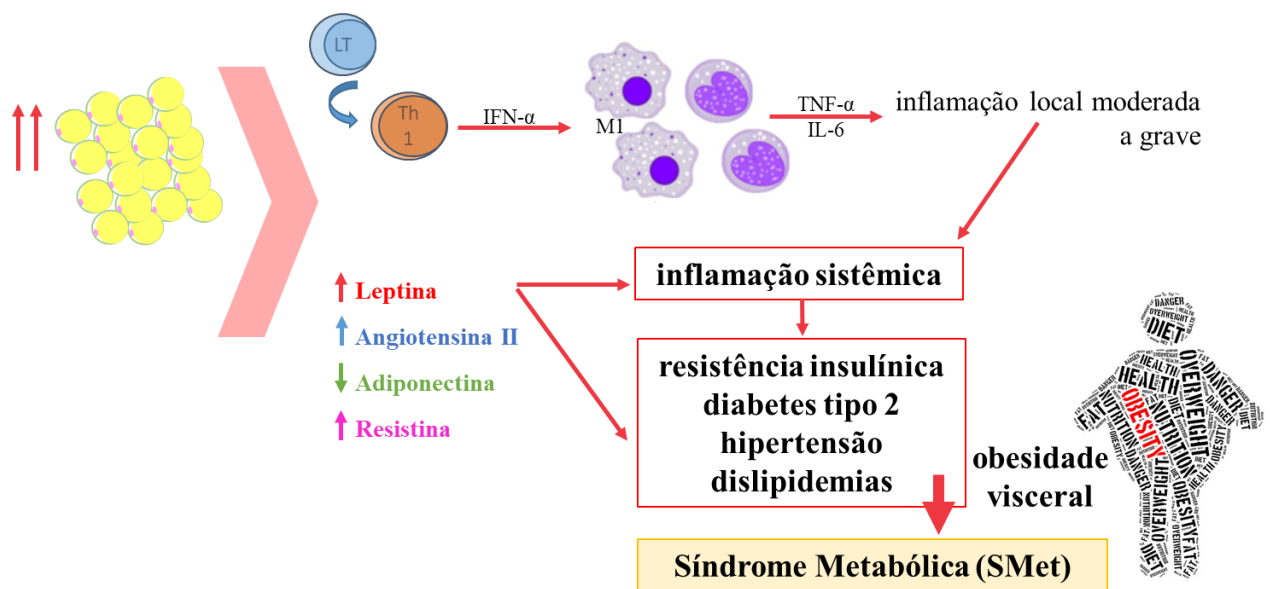
através da fosforilação do receptor de insulina (IR) e do substrato 1 do receptor de insulina (IRS-1) (YE & SCHERER, 2013).

No tecido adiposo, a adiponectina aumenta a captação basal de glicose sensível à insulina através da via AMPK (WU *et al.*, 2003), além de regular o metabolismo de ácidos graxos ao inibir a lipólise (WIJESEKARA *et al.*, 2010). Além disso, possui importantes funções anti-apoptóticas e regulatórias do sistema imunológico (BARATTA *et al.*, 2004; PATANE *et al.*, 2013; SCHERER, 2016). Em indivíduos obesos, a hipoadiponectinemia é frequentemente encontrada, sendo associada de forma consistente com resistência insulínica, diabetes do tipo 2 e com o aumento do risco de desenvolvimento de diversos tumores malignos (BOOTH *et al.*, 2015; YAMAUCHI *et al.*, 2003).

A resistina, descoberta em 2001, é um peptídeo de somente 12,5 kDa, com 108 aminoácidos e grande quantidade de cisteína (GALIC *et al.*, 2010; TRZECIAK-RYCZEK *et al.*, 2011), sendo de estrutura similar à adiponectina (PATEL *et al.*, 2004). Em roedores, a fonte principal de resistina encontra-se no tecido adiposo branco (STEPPAN *et al.*, 2001). Em humanos, a produção principal de resistina ocorre nos macrófagos, sendo pouca quantidade produzida pelos adipócitos (YANG *et al.*, 2003). Em situações de obesidade, no entanto, o infiltrado de macrófagos no tecido adiposo branco visceral em humanos faz desse órgão a fonte principal de resistina (CURAT *et al.*, 2006).

Nenhum receptor específico para a resistina foi encontrado ainda, mas vias intracelulares da proteína associada da adenilato ciclase 1 (CAP-1) e TLR-4 já foram apontadas como mediadoras das ações inflamatórias em monócitos (LEE *et al.*, 2014b; TARKOWSKI *et al.*, 2010). Centralmente, a resistina parece ter papel estimulatório sobre o sistema nervoso simpático, mais especificamente na inervação direcionada às fibras musculares dos vasos sanguíneos (KOSARI *et al.*, 2011) e aos rins (KOSARI *et al.*, 2012). Sabendo-se que a inervação simpática encontra-se elevada em indivíduos obesos, com diabetes ou que apresentam síndrome metabólica (ESLER *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2012; THORP & SCHLAICH, 2015), tais resultados suscitam a possibilidade de que a resistina contribua para as complicações cardiovasculares associadas a tais distúrbios metabólicos.

Níveis circulatórios de resistina encontram-se aumentados em roedores e humanos com sobrepeso ou obesidade, sendo reduzidos consideravelmente após administração de rosiglitazona ou anticorpos anti-resistina (GUZIK *et al.*, 2006; STEPPAN *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* evidenciam que a ativação de macrófagos com LPS ou citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) levam ao aumento da produção de resistina durante a infecção (TRZECIAK-RYCZEK *et al.*, 2011). Sua produção também já foi descrita após estímulo hiperglicêmico, ou por ação de hormônios do crescimento e gonadais, além de agir sobre os próprios adipócitos, promovendo à resistência insulínica (GUZIK *et al.*, 2006) (Figura 1).



**Figura 1: Esquemática de alguns dos principais processos na fisiopatologia da obesidade.** O aumento do reservatório de tecido adiposo branco leva às alterações inflamatórias (parte superior) e hormonais (parte inferior) importantes que contribuem fortemente para o desenvolvimento da síndrome metabólica. Dentre as alterações inflamatórias vemos o aumento da diferenciação de linfócitos do tipo Th 1, conhecidos pela liberação de quimiocinas inflamatórias que geram desequilíbrio entre as duas populações de macrófagos ao aumentar a ativação de macrófagos do subtipo M1, células que têm o papel de apresentar antígenos, secretar citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, sendo seus principais produtos o fator de necrose tumoral alfa e a interleucina 6. Tais alterações levam a inflamação local moderada a grave e, visto que o tecido adiposo é ricamente vascularizado, as concentrações aumentadas dessas citocinas logo atingem a circulação sistêmica e provocam um quadro inflamatório generalizado. Por ser um órgão endócrino, uma maior quantidade de tecido adiposo branco também leva às alterações hormonais, dentre as quais podemos citar o aumento da leptina e redução da adiponectina, aumento dos componentes do SRAA, como a angiotensina II e aumento da resistina, que intensificam o quadro inflamatório sistêmico e contribuem para a fisiopatologia de outras comorbidades, como a resistência insulínica, diabetes tipo 2, hipertensão e dislipidemias, que associadas à obesidade visceral levam à síndrome metabólica em indivíduos. IFN- $\alpha$ : interferon alfa, TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral alfa, IL-6: interleucina-6, SMet: síndrome metabólica, SRAA: sistema renina angiotensina aldosterona (LUMENG *et al.*, 2007; SALTIEL & OLEFSKY, 2017; LIMA & CURI, 2012; THORP & SCHLAICH, 2015; GRUNDY *et al.*, 2005; CERSOSIMO & DE FRONZO, 2006; BARON *et al.*, 1996; HAFNNER *et al.*, 2000; FRANSSEN *et al.*, 2011; KLOP *et al.*, 2013; RACHED *et al.*, 2014; KONUKOGLU *et al.*, 2006; FORTUÑO *et al.*, 2010).

### 2.2.3. Obesidade na síndrome metabólica

A síndrome metabólica (SMet) caracteriza-se por um conjunto de sintomas frequentemente encontrado em indivíduos obesos (GRUNDY *et al.*, 2005). Em humanos, a definição mais completa da SMet é de que ela é caracterizada pela presença de três ou mais dos cinco seguintes critérios combinados: (1) medidas da circunferência de cintura superior a valores normais estipulados para cada população e continente (ALBERTI *et al.*, 2009); (2) pressão sanguínea acima de 130/85 mmHg; (3) triglicérido (TG) sérico superior a 150 mg/dL no jejum; (4) lipoproteína de alta densidade (HDL) em níveis séricos inferiores a 40 (homens) ou 50 mg/dL (mulheres) em jejum e; (5) glicemia de jejum superior a 100 mg/dL (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM, 2002; ALBERTI *et al.*, 2009). Tal definição é uma das mais utilizadas na atualidade, pois incorpora fatores essenciais de hiperglicemia e resistência insulínica, obesidade visceral, dislipidemia aterogênica e hipertensão (HUANG, 2009).

Dentre estes fatores, a hiperglicemia e consequente resistência insulínica associada a obesidade visceral parecem ser fundamentais para a instalação da síndrome metabólica, visto que a perda de peso em pacientes leva a melhora concomitante de múltiplos fatores. Tal fato também sugere que o aumento da adiposidade esteja envolvido na fisiopatologia da SMet. Além disso, alguns pacientes obesos não manifestam nenhum dos demais componentes da SMet, de forma que tanto a predisposição metabólica a resistência insulínica e a obesidade parecem ser necessários para a expressão do fenótipo da doença (GRUNDY *et al.*, 2005; HUANG, 2009).

A dislipidemia aterogênica é caracterizada pela hipertrigliceridemia, aumento do VLDL (do inglês, *very-low-density lipoprotein*) e de partículas LDL (do inglês, *low density lipoprotein*), associada à redução dos níveis do colesterol HDL (FRANSSEN *et al.*, 2011). A hipertrigliceridemia reduz o *clearance* de outras lipoproteínas ricas em triglicéridos (PATSCHE *et al.*, 1992) e induz a formação de mais moléculas de LDL (CAPELL *et al.*, 1996) e, conseqüentemente, o aumento de triglicéridos tem sido implicado como a maior causa do surgimento das demais alterações dislipidêmicas (KLOP *et al.*, 2013). O aumento de ácidos graxos na corrente sanguínea também é observado, sendo importante no desenvolvimento da resistência insulínica (CAPURSO & CAPURSO, 2012).

Alterações na lipídemia são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como infarto do miocárdio, doenças coronárias ou da circulação periférica (PERK *et al.*, 2012; RACHED *et al.*, 2014) em populações por todo o mundo, independente da região geográfica ou do índice de desenvolvimento do país (BERENSON & SRINIVASAN, 2010; MISRA & SHRIVASTAVA, 2013; OLAMOYEGUN *et al.*, 2016; GONZÁLES-RIVAS *et al.*, 2018; OPOKU *et al.*, 2019) e fundamentais para a instalação da SMet.

A hipertensão é uma condição patológica onde a força do sangue contra as paredes das artérias é alta, e em humanos, é definida como uma pressão sanguínea superior a 140/90 mmHg (milímetros de mercúrio). Geralmente não apresenta sintomas e, com o passar do tempo, pode levar a doenças importantes como falência cardíaca e acidente vascular cerebral (AVC) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2019). A obesidade pode levar a hipertensão por mecanismos diversos, alguns já mencionados anteriormente, como a ativação

do sistema renina-angiotensina-aldosterona, resistência insulínica e resistência aos efeitos anorexigênicos da leptina. Além disso, outros mecanismos incluem ação da hiperleptinemia como a disfunção endotelial, aumento da atividade simpática do sistema nervoso autônomo, expansão de volume sanguíneo devido ao aumento na retenção de sódio nos rins e maior atividade pró-coagulatória (SATO *et al.*, 1999; WOFFORD & HALL, 2004; BELTOWSKI *et al.*, 2004; KONSTANTINIDES *et al.*, 2006; KONUKOGLU *et al.*, 2006; FORTUÑO *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2013).

De acordo com o exposto, concluímos que cada componente da SMet é um fator de risco independente para doenças cardiovasculares e, portanto, a combinação desses fatores aumenta a incidência e gravidade de doenças do sistema cardiovascular, como disfunção microvascular, aterosclerose e calcificação das artérias coronárias, disfunção cardíaca e infarto (TUNE *et al.*, 2017).

Anteriormente negligenciada, hoje sabe-se que a microbiota intestinal apresenta papel central no metabolismo de seu hospedeiro, principalmente em processos relacionados à homeostase energética, metabolismo glicídico e lipídico (SONNENBURG & BACKHED, 2016). A disbiose - desequilíbrio entre as populações bacterianas no intestino - está envolvida na patologia de uma inflamação crônica de baixa intensidade que tem sido associada a uma série de doenças metabólicas (WISNIEWSKI *et al.*, 2019).

A composição da microbiota pode ser afetada pela alimentação do hospedeiro. Quanto a quantidade ou composição lipídica na alimentação, LAM e colaboradores (2015) demonstraram que dietas hiperlipídicas com gordura saturada (HFD-sat) ou com ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega-6 (HFD-n6) são capazes de induzir ganho de peso. No entanto, somente em animais alimentados com HFD-sat houve intolerância insulínica, aumento da permeabilidade colônica e inflamação mesentérica (LAM *et al.*, 2015). Estudos em camundongos tratados com probióticos evidenciam o papel da microbiota intestinal na regulação lipídica do hospedeiro. Em camundongos alimentados com dieta hiperlipídica e com excesso de colesterol, *Lactobacillus curvatus* somente ou em associação com *Lactobacillus plantarum* promoveu redução do colesterol no plasma e fígado (YOO *et al.*, 2013). Efeito semelhante foi observado em ratos em modelo de obesidade induzido por dieta: a suplementação com *Bifidobacterium spp* foi capaz de reduzir os níveis sanguíneos de triglicérides e LDL, bem como aumentar os níveis de HDL (AN *et al.*, 2011). Dessa forma, observamos que a microbiota intestinal, juntamente com a dieta, é capaz de regular os níveis e o metabolismo de lipídeos no hospedeiro, tanto no sangue quanto em tecidos.

Dessa forma, podemos concluir que durante o estabelecimento da obesidade há uma série de alterações inflamatórias e hormonais no tecido adiposo e de forma sistêmica, que se relacionam com um ou mais dos fatores essenciais para o estabelecimento da síndrome metabólica. Tal interação pode ser realizada de forma direta ou indireta, corroborando com o agravamento do quadro metabólico e aumentando o risco de surgimento de comorbidades.

### **2.3. Programação fetal: definições e consequências da obesidade parental**

Dentre as décadas de 1960 e 1970, pesquisadores começaram a observar que a redução de calorias ingeridas ou o menor aporte de proteínas fornecido para a fêmea durante a gestação e a lactação afetava o crescimento e a capacidade cognitiva da prole de mamíferos



em diferentes modelos experimentais (ROEDER & CHOW, 1972; MCCANCE, 1976). Tal observação foi base da teoria da origem do desenvolvimento da saúde e doença (teoria conhecida pela sigla DOHaD, do inglês *developmental origins of health and disease*), proposto inicialmente pelo epidemiologista inglês David Barker. De acordo com o pesquisador, a programação que o indivíduo sofreu durante a vida fetal e a infância, juntamente com a interação genética e ambiental na vida adulta, estavam na origem das causas de doenças degenerativas em adultos (BARKER, 1990).

O conceito atual de programação sugere que insultos ambientais, nutricionais ou hormonais durante períodos críticos do desenvolvimento e crescimento podem levar a consequências a curto ou longo prazo na saúde do indivíduo (LUCAS, 1994; SIMMONS, 2005; BARKER, 2007). Dessa forma, um feto em desenvolvimento em um ambiente uterino hostil - como subnutrição ou excesso de nutrientes, infecções ou perturbações químicas, metabólicas ou hormonais (GLUCKMAN *et al.*, 2008) - responderia com adaptações (conhecidas como PAR, do inglês *predictive adaptive responses*), fundamentais para a viabilidade do feto viável nas condições disponíveis e também no futuro, caso o mesmo ambiente se mantenha posteriormente (HALES & BARKER, 2001; GLUCKMAN *et al.*, 2005).

Alguns exemplos de adaptações de curto prazo que o feto pode desenvolver em tais cenários incluem: a infrarregulação de componentes metabólicos ou endócrinos, bem como redução do crescimento de órgãos específicos, na tentativa de balancear a demanda e suprimento energético, em caso de escassez de nutrientes (OSMOND *et al.*, 1993). Mudanças de longo prazo ou irreversíveis no desenvolvimento, estrutura e função de tecidos e órgãos (como o timo, músculo esquelético e cardíaco, pulmões, pâncreas, fígado e rins) podem acontecer como resultado de expressão gênica defeituosa, diferenciação e proliferação celular (SIMMONS, 2005; MANDY & NYIRENDA, 2018).

Tais alterações ocorrem porque, quando o insulto é interrompido, as PARs não permitem que o organismo se adapte à nova condição (HALES & BARKER, 1992), dando origem às doenças não comunicáveis (HALES & BARKER, 1992; MANDY & NYIRENDA, 2018). A susceptibilidade a doenças crônicas em animais programados na vida adulta tem se mostrado diferente entre machos e fêmeas (GABORY *et al.*, 2009; BALE, 2011; VAN ABELEN *et al.*, 2011; WADDELL & MCCARTHY, 2012; BARKER, 1992; WALKER & HO, 2012), de forma que o estudo de ambos os sexos no contexto da programação metabólica é relevante e necessário.

### **2.3.1. Obesidade materna**

Em humanos, a obesidade materna é definida com base no índice de massa corporal (IMC) antes da concepção. No entanto, pesquisadores discutem que essa medida não é precisa, pois não determina a quantidade de massa gorda e massa magra totais, nem identifica as áreas de deposição de gordura, informações consideradas relevantes na patogênese das condições entre mãe e feto (DULLOO *et al.*, 2010). Estudos epidemiológicos demonstram associações positivas entre a obesidade materna e maior risco de obesidade precoce e desenvolvimento da SMet na geração subsequente (BONEY *et al.* 2005; SRIDHAR *et al.*

2014), bem como aumento da ocorrência de fetos grandes para a idade gestacional, macrosomia e mortalidade neonatal (BONEY *et al.* 2005; OKEN *et al.* 2008; REYNOLDS *et al.* 2013), aumento do risco de doenças cardiovasculares em crianças (DRAKE & REYNOLDS, 2010; POSTON, 2012; O'REILLY & REYNOLDS, 2013) e maior incidência de obesidade e diabetes na fase adulta (ARMITAGE *et al.* 2008; SCHELLONG *et al.* 2012; SPARANO *et al.* 2013). Apesar da epidemiologia mostrar as associações entre obesidade materna e comorbidade cardiometabólica da prole, os mecanismos ou causas para que isto ocorra são melhor compreendidos com o uso de modelos experimentais.

Dentre os modelos de obesidade materna, os que modificam a dieta materna são os mais utilizados, possivelmente por serem mais simples e que mais se assemelham à realidade da obesidade em humanos. Na pesquisa científica, diversos tipos de dieta se mostram efetivas para a indução da obesidade. Grande parte delas são hipercalóricas, por adição de carboidratos e/ou lipídeos, altamente palatáveis para a indução rápida da obesidade e demais alterações metabólicas encontradas em indivíduos com sobrepeso (VON DIEMEN *et al.*, 2006).

As consequências podem ser observadas ainda na juventude. Em primatas não-humanos, o fornecimento de dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação levou à hiperinsulinemia de jejum e ao prejuízo na vasodilatação arterial, em filhotes com menos de 2 anos de idade (FAN *et al.*, 2013). Já em ratos jovens programados pela obesidade materna, mesmo que sem alterações significativas no peso corporal, observou-se aumento do componente autonômico simpático na regulação da pressão arterial e da resposta hipertensora aos 30 dias de idade, que permaneceram até a fase adulta, aos 90 dias de idade, e foram acompanhadas por maior sensibilidade ao reflexo baroreceptor (SAMUELSSON *et al.*, 2010), indicando que as consequências cardiovasculares podem não estar associadas ao surgimento da obesidade.

Em outros trabalhos, no entanto, foi observado aumento de peso corporal e adiposidade na prole adulta de ratas obesas (KHAN *et al.*, 2004; SRINIVASAN *et al.*, 2006; NIVOIT *et al.*, 2009; FRANCO *et al.*, 2012). NIVOIT e colaboradores (2009) observaram que, ao desmame, ratos Wistar machos e fêmeas apresentaram maior peso corporal que a prole controle. Aos 3 meses, os filhotes machos apresentaram intolerância a glicose e aos 10 meses apresentaram hiperinsulinemia. Ao final do 12º mês, machos e fêmeas da prole de ratas obesas apresentaram aumento na adiposidade (NIVOIT *et al.*, 2009). De forma semelhante, em ratos da linhagem Sprague-Dawley, observou-se que, aos 30 dias de idade, os filhotes da prole de ratas obesas eram mais pesados que os filhotes controle que progrediu para obesidade, hiperglicemia, resistência insulínica e dislipidemias na fase adulta (SRINIVASAN *et al.*, 2006).

Em modelo de obesidade materna em camundongos, induzida por dieta rica em açúcares e lipídeos, foi observado o surgimento de disfunções cardíacas (redução da velocidade de relaxamento e sobrecarga simpática) sem alteração do peso corporal ou dislipidemias na prole macho adulta (BLACKMORE *et al.*, 2014). No entanto, outro trabalho observou aumento do consumo energético e aumento do peso corporal (mais proeminente nos filhotes machos), aumento de adiposidade visceral e das concentrações séricas de triglicérides, leptina e insulina, hipertensão, aumento da reatividade vascular a noradrenalina e menor relaxamento induzido pela acetilcolina, além de menor atividade locomotora noturna (SAMUELSSON *et al.*, 2008).

A obesidade materna também é capaz de comprometer aspectos da saúde mental (CONTU & HAWKES, 2017). Estudos em primatas não-humanos indicam que a obesidade materna afeta a prole fêmea jovem, que apresentam aumento na ansiedade a novos estímulos, o que não acontece com os machos (SULLIVAN *et al.*, 2010). De forma semelhante, experimentos utilizando roedores indicaram que o consumo de dieta hiperlipídica antes da concepção e durante gestação e lactação é capaz de aumentar o comportamento ansiolítico da prole macho e fêmea em 1 a 3 meses de idade (BILBO & TSANG, 2010; PELEG-RAIBSTEIN *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2014). Tais resultados parecem variar de acordo com o tempo e tipo de dieta na qual a matriz é exposta (RODRIGUEZ *et al.*, 2012; WRIGHT *et al.*, 2011), ou no grau de cuidado materno, como o *lamber* da prole e o grau de *grooming* (SPEIGHT *et al.*, 2017), fatores sabidamente influenciadores no grau de ansiedade na prole, através de alterações epigenética na expressão de receptores de glicocorticoides (CHAMPAGNE & MEANEY, 2001). Em relação à depressão, experimentos sugerem que a exposição à obesidade materna em roedores leva ao aumento de sintomas análogos à depressão na prole macho ainda jovens (GIRIKO *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2015; BALSEVICH *et al.*, 2016).

### 2.3.2. Obesidade paterna

Além da mudança do ambiente intrauterino como importante fator de programação metabólica, alguns trabalhos têm proposto a participação do status nutricional e fisiológico paterno no momento da concepção. Estudos em humanos demonstraram que a obesidade paterna influencia o *status* reprodutivo de seus filhos através da redução da motilidade espermática (HAMMOUD *et al.*, 2009), maiores incidências de anormalidades espermáticas (KORT *et al.*, 2006) e fragmentação do DNA no interior das células germinativas (CHAVARRO *et al.*, 2011). Adicionalmente, podem levar ao aumento do estresse oxidativo espermático e disfunção mitocondrial (ORNELLAS *et al.*, 2017).

Em um estudo familiar desenvolvido por CHEN e colaboradores (2012), o IMC paterno foi positivamente correlacionado com o peso ao nascer, circunferência da cabeça, diâmetro e circunferência abdominal, e diâmetro torácico de filhotes machos somente (CHEN *et al.*, 2012). Outros trabalhos demonstram que a prole macho de pais (KAATI *et al.*, 2007) ou avôs (BYGREN *et al.*, 2001) expostos ao excesso de nutrientes na infância apresentam menor longevidade, onde os netos apresentam risco quatro vezes maior de desenvolver diabetes na fase adulta (KAATI *et al.*, 2002). De acordo com um levantamento bibliográfico realizado por ORNELLAS e colaboradores (2017), a obesidade paterna em humanos pode levar à resistência insulínica ou diabetes, bem como aumento do nível de cortisol no sangue umbilical. Tais fatores são conhecidamente predisponentes ao desenvolvimento da doença cardiovascular (ORNELLAS *et al.*, 2017). Pouco se discute sobre a influência paterna na linhagem feminina.

Na pesquisa científica, grande parte do conhecimento têm sido construído nos últimos 10 a 15 anos, utilizando-se diferentes espécies de vertebrados ou invertebrados (NG *et al.*, 2010; OST *et al.*, 2014; BINDER *et al.*, 2015; ORNELLAS *et al.*, 2015; CHOWDHURY *et al.*, 2016). Resultados crescentes indicam que a obesidade paterna apresenta impactos deletérios na fertilidade e desenvolvimento fetal durante a posterior gestação e pode

programar o fenótipo da prole por até duas gerações (FULLSTON *et al.*, 2016). OST e colaboradores (2014) alimentaram machos da espécie *Drosophila melanogaster* com excesso de sucrose e observaram aumento de peso corporal na geração seguinte, além de sensibilidade aumentada para desenvolver obesidade, visto que a exposição de dieta obesogênica levou a aumento do peso corporal, acúmulo de TAG e lipídeos (OST *et al.*, 2014). No entanto, a transmissão deste fenótipo não ocorreu nas gerações seguintes, visto que as gerações F2 e F3 não apresentaram alterações fenotípicas (OST *et al.*, 2014).

Em mamíferos, de forma semelhante, a obesidade paterna é capaz de predispor a doenças relacionadas à obesidade e SMet na prole (NG *et al.*, 2010), além de comprometimento da lipogênese hepática (ORNELLAS *et al.*, 2015) e danos renais (CHOWDHURY *et al.*, 2016). NG e colaboradores (2010) alimentaram ratos machos com HFD para induzir obesidade e diabetes. Os filhotes fêmeas, na 13ª semana de idade, não apresentaram qualquer alteração em parâmetros hormonais e metabólicos basais (NG *et al.*, 2010). No entanto, o teste de tolerância a glicose demonstrou prejuízo no metabolismo glicídico e dados do RNA sequencial (RNAseq) de amostras das ilhotas pancreáticas indicaram redução da expressão gênica de elementos relacionados a exocitose dos grânulos de insulina (NG *et al.*, 2010).

Em camundongos, o consumo paterno de dietas obesogênicas pode levar a implicações durante o desenvolvimento intrauterino do embrião. BINDER e colaboradores (2015) demonstraram que o consumo de HFD contendo 22% de lipídeos (equivalente à dieta de cafeteria) acarretou em menor grau de implantação, redução do peso fetal e placentário, e hipermetilação geral na placenta unicamente de filhotes fêmeas (BINDER *et al.*, 2015). Além disso, já foi descrito que a obesidade paterna pode levar ao prejuízo metabólico e reprodutivo de filhotes machos por até duas gerações subsequentes (FULLSTON *et al.*, 2012; 2013).

Quanto às alterações metabólicas em camundongos na fase adulta, o que se sabe ainda é pouco. Em camundongos C57BL/6, a obesidade paterna não foi capaz de alterar peso corporal, adiposidade, colesterol ou TAG na F1 com 12 semanas de idade. No entanto, observou-se hiperglicemia, hiperinsulinemia, hipoadiponectinemia, redução do *clearance* da glicose no teste de tolerância à glicose, aumento da massa hepática e acúmulo de TAG hepático (ORNELLAS *et al.*, 2015). Já na linhagem ICR (do inglês, *Institute Cancer Research*, uma linhagem do tipo *outbreed* altamente susceptível à obesidade), foi descrito que o consumo paterno de dieta com 62% de lipídeos leva ao aumento do peso corporal e adiposidade, associados ao aumento de TAG e leptina sistêmicos e redução dos níveis de adiponectina em filhotes machos e fêmeas da F1, além de aumento da pressão arterial sistólica (MASUYAMA *et al.*, 2016). No entanto, tais efeitos não foram transmitidos para a geração F2 e F3 (MASUYAMA *et al.*, 2016).

Sabe-se que a obesidade pode afetar negativamente a função cognitiva em humanos e animais (ELIAS *et al.*, 2005; STRANAHAN *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2011b; WANG *et al.*, 2015), e que a obesidade materna também modula as respostas ansiolíticas da prole adulta (SULLIVAN *et al.*, 2010; BILBO & TSANG, 2010; PELEG-RAIBSTEIN *et al.*, 2012; KANG *et al.*, 2014). No entanto, poucos estudos comentam sobre o papel da obesidade paterna nesse contexto. ZHOU e colaboradores (2018) recentemente mostraram que a F1 de camundongos obesos apresenta comprometimento de aprendizado e memória, bem como alterações morfológicas hipocâmpais na 8ª semana de idade, sem que essa alteração seja transmitida para a geração F2 (ZHOU *et al.*, 2018). Tal fato foi atribuído à transmissão

epigenética, visto que a região promotora do BDNF (do inglês, *brain-derived neurotrophic factor*) de espermatozoides encontrava-se hipermetilada na geração F0, mas não na F1 (ZHOU *et al.*, 2018).

### 2.3.3. Herança epigenética e suas possibilidades

O termo epigenética tem sido utilizado para explicar uma série de observações biológicas, e foi inicialmente proposto por Conrad Waddington, em 1942. Atualmente, a definição mais aceita é a de que epigenética é o estudo de mudanças reversíveis na função gênica que são mitoticamente e/ou meioticamente herdáveis e que não alteram estruturalmente a sequência do DNA (ARMSTRONG, 2014; HEARD & MARTIENSSSEN, 2014). Sendo assim, o termo herança epigenética consiste na transmissão de certos marcadores epigenéticos para a prole (VAN OTTERDIJK & MICHELS, 2016; PANG *et al.*, 2017).

Os três substratos moleculares envolvidos no processo epigenético são: (1) a própria molécula de DNA; (2) as histonas, proteínas que auxiliam na condensação da cromatina e estão em contato direto com o DNA e; (3) moléculas específicas de RNA, os chamados RNA não-codificantes (ARMSTRONG, 2014). As modificações epigenéticas incluem metilação do DNA, ligação e condensação da cromatina, empacotamento do DNA em nucleossomos e modificações covalentes nas histonas (DOLINOY & JIRTLE, 2008), e são dependentes do tipo celular, sendo moduladas de forma precisa e coordenada durante toda a vida (FEIL & FRAGA, 2012; LISTER *et al.*, 2009).

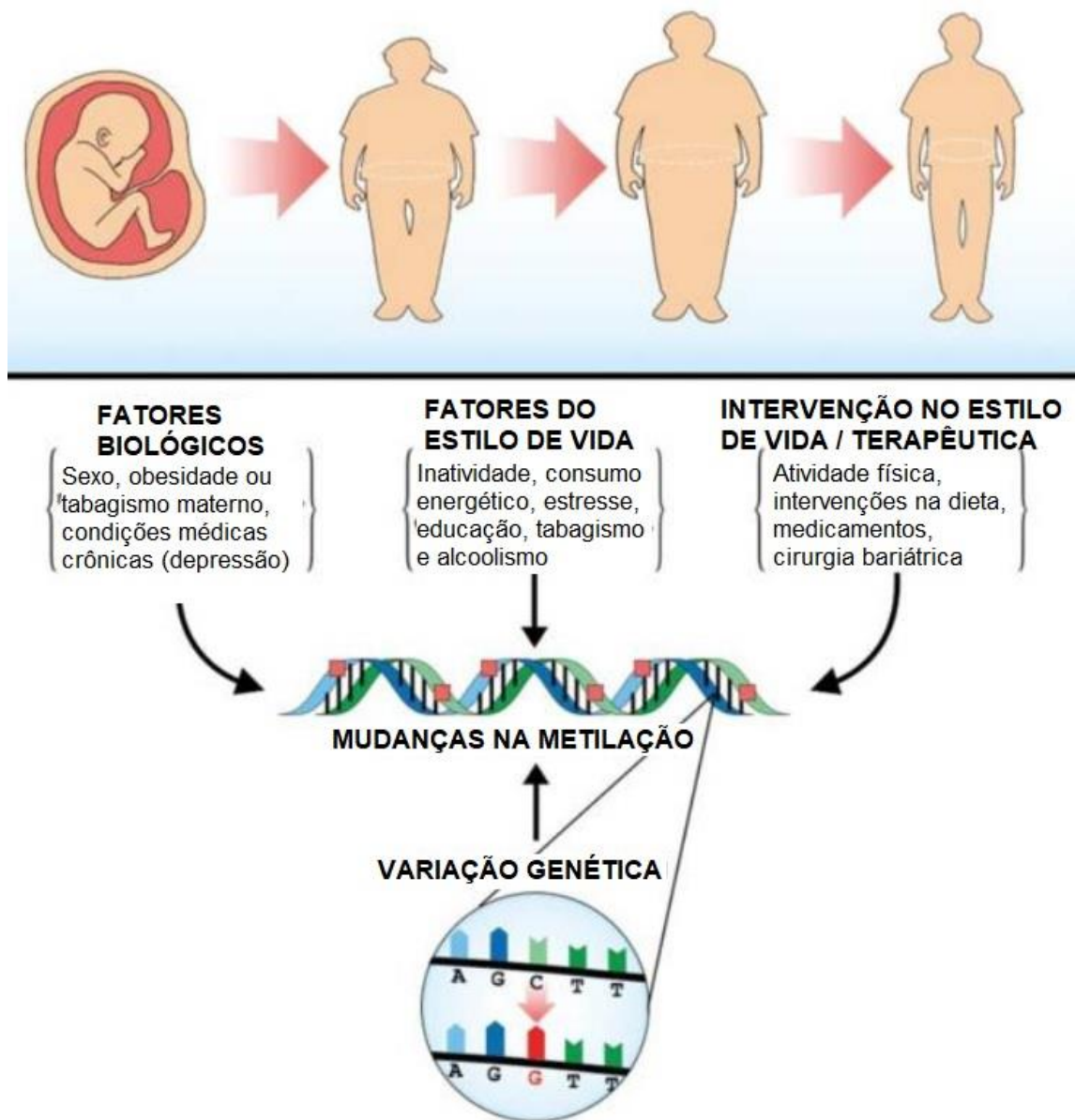
A herança epigenética pode ser dividida em intergeracional e transgeracional. A primeira representa a transmissão de marcadores epigenéticos de uma geração para a outra, enquanto que a transmissão entre avôs e netos é denominada transgeracional (SKINNER, 2008; PANG *et al.*, 2017). No entanto, é importante enfatizar as diferenças entre a transmissão de características materna e paterna. Insultos que afetam a fêmea durante a gestação (F0) pode afetar diretamente não somente a primeira geração (F1) como também as células germinativas que darão origem à geração F2. Por essa razão, somente na geração F3 podemos analisar alterações herdadas puramente epigeneticamente. Por outro lado, na linhagem paterna, os efeitos indiretos de insultos na geração F0 afetariam somente a próxima geração (F1), de forma que a observação de características transmitidas por via epigenética exclusivamente já é possível a partir da geração F2 (LACAL & VENTURA, 2018).

Dessa forma, apesar da enorme quantidade de trabalhos que estudam a programação fetal em um ambiente de obesidade materna, poucos são considerados estudos epigenéticos. Em modelo de obesidade em ratos por administração de glutamato monossódico, observou-se que a obesidade materna não modifica o peso do feto nem da placenta, mas leva a maior frequência de malformações fetais na F3 (SOARES *et al.*, 2018). EATON e colaboradores (2018), por sua vez, utilizaram modelo genético A<sup>vy</sup> de obesidade materna para o estudo epigenético. Neste modelo, filhotes machos das gerações F1, F2 e F3 apresentaram predisposição à resistência aos efeitos hepáticos da insulina somente quando desafiados com dieta hiperlipídica, possivelmente através da superregulação do gene *Apoa4* (apolipoproteína A4) hepático, permanecendo sem alterações metabólicas em dieta controle (EATON *et al.*,

2018). Em modelo de obesidade parental induzidas por dieta, DUNN & BALE (2011) demonstraram que, em camundongos, o consumo de HFD gerou aumento de peso e adiposidade, intolerância a insulina e programação do eixo do hormônio do crescimento (GH) na geração F1, sendo que somente o maior peso e comprimento corporal foram transgeracionalmente transmitidos, via linhagem paterna, em fêmeas F3 (DUNN & BALE, 2011).

Aberrações epigenética têm sido implicadas em diversas doenças, como câncer, doenças metabólicas, autoimunes, cardiovasculares, neurodegenerativas, frequentemente associadas ao envelhecimento (VAN OTTERDIJK *et al.*, 2013; JUNG & PFEIFER, 2015). Por ser uma doença metabólica multifatorial, a transmissão da obesidade é estudada na visão genética e ambiental ao longo das décadas. No entanto, estudos com gêmeos idênticos deixam claro que os fatores ambientais podem influenciar o genótipo, interferindo no desenvolvimento da obesidade (STUNKARD *et al.*, 1986; BOUCHARD *et al.*, 1990). Tais fatores incluem a redução da diversidade da microbiota intestinal, privação de sono, disruptores endócrinos, redução na variação da temperatura ambiente, considerados indicadores epigenéticos importantes para a compreensão da prevalência da obesidade (MCALLISTER *et al.*, 2009; CHOQUET & MEYRE, 2011).

Em humanos, estudos epigenéticos tem demonstrado que a obesidade, variações genéticas e exposição a determinadas situações ambientais podem influenciar o grau de metilação do DNA, sugerindo um mecanismo para a intrincada relação entre gene-ambiente, esquematizado a seguir, na Figura 2.



**Figura 2: Diagrama que indica a complexa relação entre fatores genéticos e do meio ambiente que culminam em alterações no padrão de metilação do DNA observadas em indivíduos obesos.** Fatores biológicos – como o sexo, ou fatores ligados ao meio ambiente uterino durante a gestação, como obesidade e tabagismo materno, – fatores do estilo de vida – como sedentarismo, dietas hiperlipídicas e/ou hiperglicídicas, estresse e tabagismo – e a própria variação genética entre os indivíduos são capazes de promover mudanças na metilação de importantes genes associados ao fenótipo da obesidade. Da mesma forma, intervenções terapêuticas ou na mudança do estilo de vida são capazes de modular a epigenética e melhorar a condição de saúde do indivíduo (adaptada de REDDON *et al.*, 2016).

No contexto da obesidade paterna, modelos experimentais demonstram que algumas características podem ser transmitidas antes do nascimento, através de mecanismos de transmissão epigenéticos no esperma – como metilação do DNA, modificações na cromatina e através dos RNAs não codificantes (WU *et al.*, 2015), bem como através de modificações ambientais pós concepção durante a gravidez ou no período pós-natal. Tais influências ocorreriam em espécies cujo cuidado paterno é observado, onde há possibilidade de modulação do ambiente e fisiologia materna durante a gestação (via exposição passiva ao cigarro, estresse, suporte emocional, etc), gerando efeitos no microambiente intrauterino e que podem alterar marcações epigenéticas no feto em desenvolvimento (GREEN & MARSIT, 2015). No período pós-natal, os fatores influenciadores paternos mais estudados epidemiologicamente são: frequência e forma de cuidado paterno, circunstâncias socioeconômicas, hábitos de saúde e estilo de vida (WAKE *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2017; JUONALA *et al.*, 2019), onde a epigenética igualmente pode ser importante para a manifestação biológica deste efeito (LAWN *et al.*, 2018). No entanto, estudos experimentais ainda são precários nessas abordagens, visto as dificuldades de reproduzir em laboratório essas complexas interações.

A utilidade e importância de estudos epigenéticos focados na herança epigenética, dessa forma, se concentram em dois aspectos principais: (1) na compreensão de mecanismos pelos quais a programação fetal pode ocorrer e, conseqüentemente, em métodos de ação para que esta seja evitada ou minimizada durante os períodos críticos de desenvolvimento do indivíduo e; (2) por ser um mecanismo de grande plasticidade e herdabilidade, pode ser convertido no campo da medicina personalizada, de forma que o melhor tratamento, intervenção ou procedimento cirúrgico seja indicado de forma única para cada indivíduo, garantindo maior eficácia no tratamento (BLAKEMORE & FROGUEL, 2010; REDDON *et al.*, 2016).

Considerando todo o exposto, a hipótese do presente trabalho é que o consumo de dieta hiperlipídica levaria ao desenvolvimento da obesidade e distúrbios metabólicos em camundongos adultos machos e fêmeas, que posteriormente transmitiriam de forma epigenética algumas dessas alterações às gerações subsequentes, de forma que filhotes machos e/ou fêmeas teriam maior predisposição ao desenvolvimento de doenças metabólicas, comportamentais e/ou cardíacas, como proposto pela teoria DOHaD.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos metabólicos, comportamentais e de função cardíaca do consumo de dieta hiperlipídica em camundongos machos e fêmeas após desenvolvimento da obesidade; avaliar os efeitos intergeracionais da obesidade materna em aspectos metabólicos, comportamentais e de função cardíaca em duas gerações subsequentes de camundongos adultos machos e fêmeas e, avaliar os efeitos inter e transgeracionais da obesidade paterna em aspectos metabólicos, comportamentais e de função cardíaca em duas gerações subsequentes de camundongos adultos machos e fêmeas.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Analisar as proporções de massa gorda e massa magra, em gramas (g), que constituem a massa corporal dos animais F0 (10<sup>a</sup> semana de idade), F1 e F2 (6, 10, 15 e 25 semanas de idade), machos e fêmeas.
- Analisar o metabolismo glicídico nos animais F0 (10<sup>a</sup> semana de idade), F1 e F2 (6, 10, 15 e 25 semanas de idade), machos e fêmeas.
- Analisar o comportamento espontâneo dos animais F0 (10<sup>a</sup> semana de idade) F1 e F2 (15<sup>a</sup> semana de idade), machos e fêmeas.
- Analisar a função cardíaca dos animais F1 e F2 (25<sup>a</sup> semana de idade), machos e fêmeas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, durante a vigência do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), na Instituição *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor- ME, USA). Todos os animais destinados ao desenvolvimento deste projeto foram acondicionados em biotério com temperatura ( $23\pm 2$  °C) e fotoperíodo (06:00-18:00h) controlados, recebendo ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental. O cuidado com os animais seguiu os princípios do *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 2011) após a devida aprovação pelo Comitê de Ética Institucional (IACUC, *Institutional Animal Care and Use Committee*), sob o número de aprovação 16011.

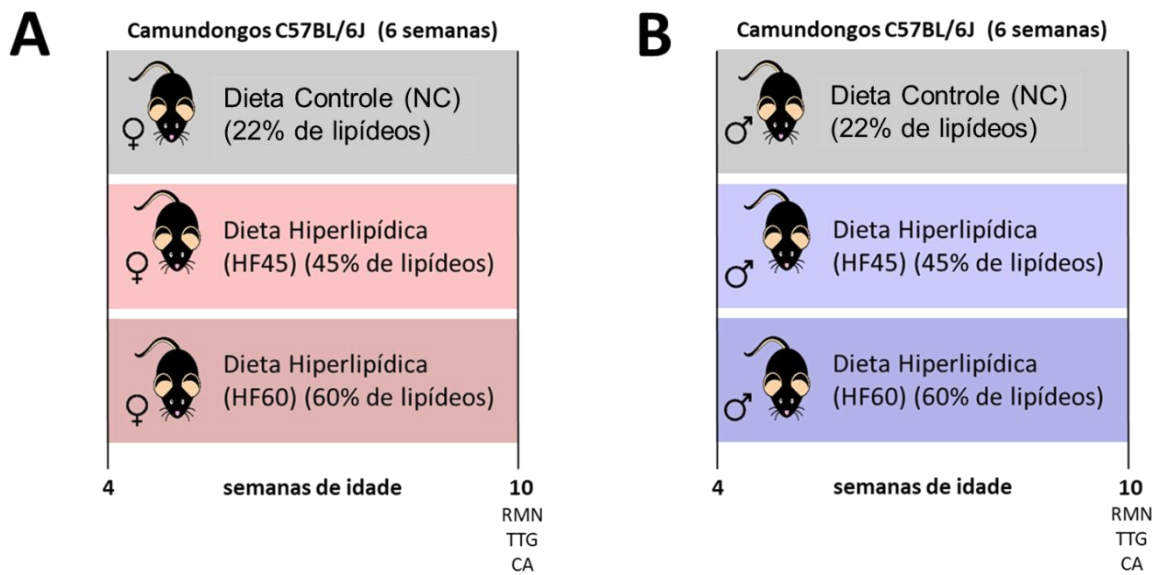
### 4.2. Desenho experimental

Camundongos fêmeas e machos da linhagem C57BL/6J, com 4 semanas de idade, foram comprados do *The Jackson Laboratory* (Bar Harbor, ME, USA) e divididos em três grupos experimentais: (1) Dieta controle (NC, 22% de lipídeos, *LabDiet*<sup>®</sup> 6F 5K52); (2) Dieta hiperlipídica de 45% de lipídeos (HF45, *Research Diets Inc.*, D12451); e (3) Dieta hiperlipídica de 60% de lipídeos (HF60, *Research Diets Inc.*, D12492) *ad libitum* durante 6 semanas consecutivas (Figura 3). As porcentagens de 22, 45 e 60% de lipídeos estão relacionadas às calorias provenientes de lipídeos, para cada dieta, e não à porcentagem do componente na dieta fornecida, como detalhado na tabela 1.

Na 10<sup>a</sup> semana de idade, os animais fêmeas e machos foram avaliados quanto aos parâmetros de composição corporal, tolerância a glicose, assim como análise comportamental. A saúde reprodutiva das camundongas fêmeas utilizadas para o acasalamento foi observada através da análise das fases do ciclo estral por 12 dias antes do acasalamento, segundo técnica descrita por MARCONDES e colaboradores (2002). As fêmeas que não apresentaram regularidade no ciclo estral em nenhum dos ciclos analisados foram excluídas do experimento. O efeito *Whiteen* descreve que o odor do feromônio de machos influencia e modifica o comportamento de fêmeas, sendo capazes de provocar efeitos que podem sincronizar o ciclo estral de camundongos fêmeas alojadas em grupos (BRAGA, 2017). Sendo assim, dois dias antes do acasalamento, o estro foi induzido através da inserção de uma toalhinha de papel na gaiola das fêmeas que anteriormente estava na gaiola dos machos. Posteriormente, os grupos NC, HF45 e HF60 foram acasalados com animais não obesos, na proporção de duas fêmeas para cada macho (2:1), por três a quatro dias consecutivos. Todos os animais permaneceram em suas respectivas dietas durante os períodos de gestação e lactação: fêmeas NC, HF45 e HF60 em suas respectivas dietas, enquanto as fêmeas que acasalaram com os machos NC, HF45 ou HF60 permaneceram em dieta controle. Ao

nascimento, 6 filhotes foram mantidos na ninhada, a fim de evitar a comparação entre ninhadas heterogêneas, sendo 3 machos e 3 fêmeas, sempre que possível.

Para avaliar se a dieta materna era capaz de alterar a capacidade reprodutiva durante a gestação e lactação, os camundongos fêmeas dos grupos NC, HF45 e HF60 também foram avaliados quanto ao percentual de nascimentos, bem como o número de filhotes por ninhada ao nascimento e o número de filhotes sobreviventes ao final da lactação.



**Figura 3: Desenho experimental do modelo de obesidade induzida por dieta.** A- Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J, com 4 semanas de idade, foram divididas em três grupos experimentais, e alimentadas com dieta controle (NC, 22% de energia proveniente de lipídeos) ou dietas hiperlipídicas (45% ou 60% de energia proveniente de lipídeos na dieta, grupos HF45 e HF60, respectivamente) *ad libitum* durante 6 semanas consecutivas. Na 10ª semana de idade, as fêmeas foram avaliadas quanto aos parâmetros de composição corporal, tolerância a glicose e análise comportamental. B- Camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com 4 semanas de idade, foram divididos em três grupos experimentais, e alimentados com dieta controle (NC, 22% de energia proveniente de lipídeos) ou dietas hiperlipídicas (45% ou 60% de energia proveniente de lipídeos na dieta, grupos HF45 e HF60, respectivamente) *ad libitum* durante 6 semanas consecutivas. Na 10ª semana de idade, os machos foram avaliados quanto aos parâmetros de composição corporal, tolerância a glicose e análise comportamental. RMN: ressonância magnética nuclear; TTG: teste de tolerância a glicose; CA: teste de campo aberto.

**Tabela 1:** Informações nutricionais sobre as dietas utilizadas no modelo experimental.

<b>Tipo de Dieta</b>	<b>Nome</b>	<b>Fornecedor</b>	<b>Macronutriente</b>	<b>Quantidade: (cada 100g)</b>	<b>Fonte de energia: calorias (%)</b>
<b>NC</b>	<i>Rat and Mouse/ Auto 6F 5K52</i>	<a href="#">LabDiet®</a>	Proteínas	19,30	22,10
			Carboidratos	53,60	61,30
			Lipídeos	14,30	16,60
			Outros	12,80	0,00
<b>HF45</b>	D12451	<a href="#">Research Diets Inc.®</a>	Proteínas	23,66	20,00
			Carboidratos	40,74	35,00
			Lipídeos	23,6	45,00
			Outros	12,00	0,00
<b>HF60</b>	D12492	<a href="#">Research Diets Inc.®</a>	Proteínas	26,23	20,00
			Carboidratos	25,56	20,00
			Lipídeos	34,90	60,00
			Outros	13,31	0,00

NC: dieta controle; HF45: dieta hiperlipídica com 45% de energia proveniente de lipídeos; HF60: dieta hiperlipídica com 60% de energia proveniente de lipídeos.

Para a obtenção da prole programada pela obesidade materna, como mencionado anteriormente, camundongos fêmeas dos grupos NC, HF45 e HF60 foram acasaladas com machos em dieta controle, dando origem a geração F1. Todos os animais F1, após o desmame, foram alimentados exclusivamente com dieta controle. Para aumentar a influência da dieta materna, na 10ª semana de idade, machos e fêmeas da geração F1 foram acasalados entre seu próprio grupo experimental para a obtenção da geração F2. Todos os animais F2 foram mantidos em dieta controle durante todo o protocolo experimental (Figura 4). As fêmeas em dieta NC deram origem às proles F1-NC e F2-NC. Fêmeas HF45 deram origem às proles F1-MHF45 e F2-MHF45, e as fêmeas do grupo HF60 deram origem às proles F1-MHF60 e F2-MHF60.

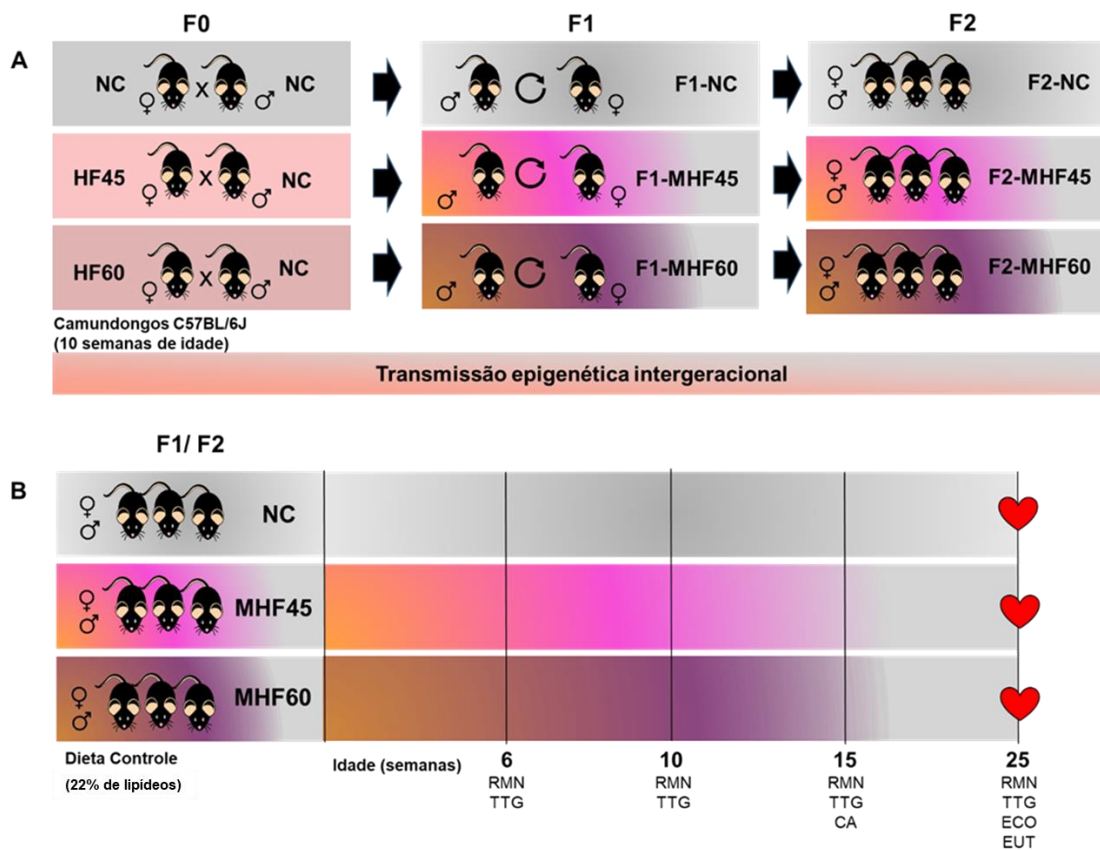
Para a obtenção da prole programada pela obesidade paterna, camundongos machos dos grupos NC, HF45 e HF60 com 10 semanas de idade foram acasalados com fêmeas em dieta controle, dando origem a geração F1. Para aumentar a influência da dieta paterna, na 10ª semana de idade, machos e fêmeas da geração F1 foram acasalados entre seu próprio grupo experimental para a obtenção da F2. Todos os animais F1 e F2 foram mantidos em dieta controle por todo o protocolo experimental (Figura 5). Machos do grupo NC deram origem às proles F1-NC e F2-NC; os do grupo HF45 deram origem às proles F1-PHF45 e F2-PHF45, enquanto os machos do grupo HF60 deram origem às proles F1-PHF60 e F2-PHF60.

As análises de composição corporal e tolerância à glicose foram realizadas nas gerações F1 e F2 nos tempos de 6, 10, 15 e 25 semanas de idade. O teste comportamental de campo aberto foi realizado na 15ª semana de idade, enquanto o ecocardiograma foi realizado na 25ª semana de idade, em ambas as gerações. Após o exame ecocardiográfico, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O coração foi dissecado e pesado. A

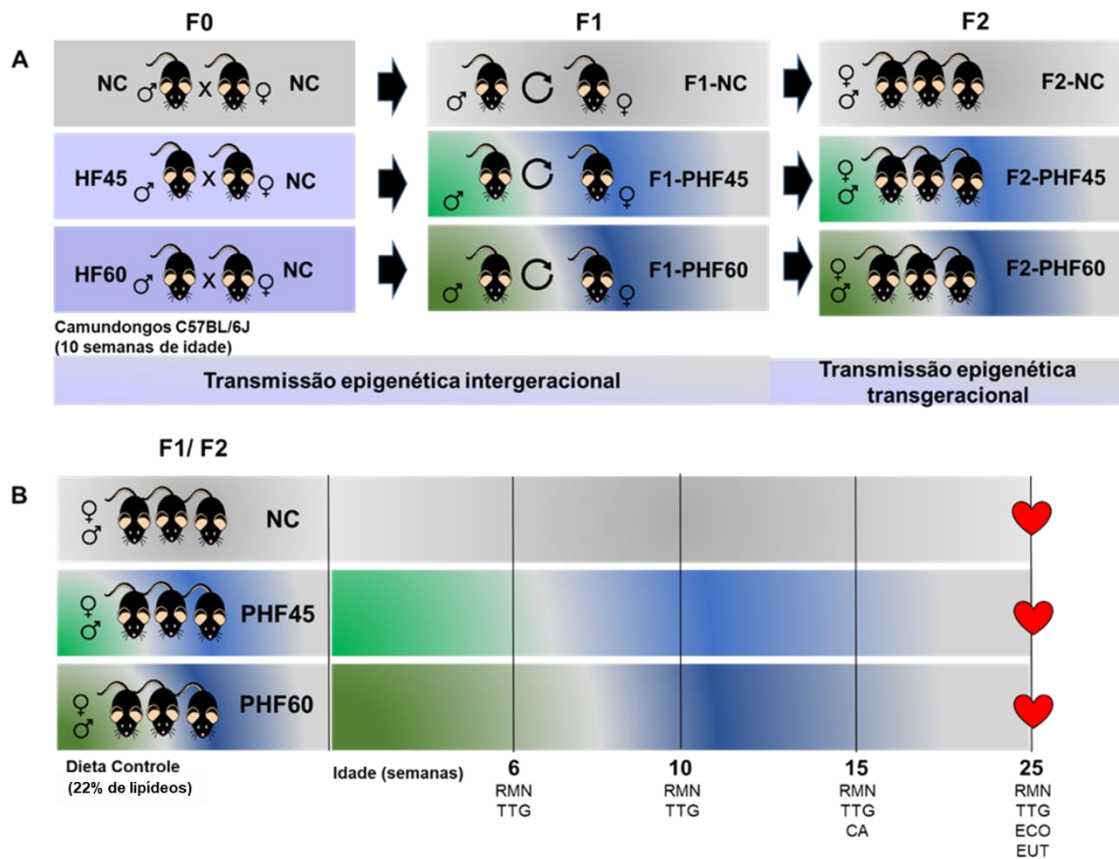
tíbia foi dissecada e seu comprimento utilizado para normalizar a massa cardíaca. O esquema da figura 4 representa graficamente o modelo experimental utilizado para o protocolo de obesidade materna, e a figura 5 representa o desenho experimental da obesidade paterna.

Em relação ao número de animais utilizado, inicialmente foram obtidos 60 camundongos fêmeas e 60 camundongos machos para a geração F0, num número total de 20 animais por grupo experimental. Tais animais, após acasalamento, deram origem à prole F1, de onde foram separados 6 filhotes por ninhada, sendo 3 machos e 3 fêmeas sempre que possível. A divisão de animais da F1 para as avaliações metabólicas, cardíacas e comportamentais seguiram-se da seguinte forma: 1 filhote macho e 1 fêmea foram separados para posteriores análises de composição corporal e de metabolismo glicídico, 1 filhote macho e 1 fêmea foram separados para as análises comportamentais e de função cardíaca, e 1 filhote macho e 1 fêmea foram separado para posterior acasalamento para obtenção da geração F2. Uma vez obtida a geração F2, foram mantidos 6 animais por ninhada, seguindo-se a mesma proporção entre machos e fêmeas sempre que possível. A divisão de animais da F2 para as avaliações metabólicas, cardíacas e comportamentais seguiram-se da seguinte forma: 1 filhote macho e 1 fêmea foram separados para posteriores análises de composição corporal e de metabolismo glicídico, 1 filhote macho e 1 fêmea foram separados para as análises comportamentais e de função cardíaca, e 1 filhote macho e 1 fêmea foram separados para posterior coleta de coração e armazenamento para análises moleculares, totalizando um número total de 780 animais utilizados para os estudos relacionados à obesidade materna e 780 animais utilizados para os estudos relacionados à obesidade paterna.

Devido ao grande número de animais necessário e às limitações espaciais no biotério de experimentação animal, os esquemas de fornecimento de dietas e acasalamento não ocorreram ao mesmo tempo. O protocolo foi dividido em três experimentos, onde os grupos de machos e fêmeas F0 NC e HF45 (e suas respectivas descendências) foram obtidos inicialmente, e os grupos NC e HF60 (e suas respectivas descendências) posteriormente. Dessa forma, em relação às análises propostas, a presente tese apresenta todos os dados relativos a F0 e F1, em todos os grupos experimentais. No entanto, quanto a geração F2, os animais da prole MHF60 e PHF60 não chegaram a idade final de 25 semanas, o que justifica que, especificamente para estas proles, não estão descritos os resultados das análises de composição corporal, metabolismo glicídico e ecocardiograma na 25ª semana de idade, bem como a análise comportamental. Tais análises serão posteriormente avaliadas, uma vez que os animais atinjam a idade final estipulada.



**Figura 4: Desenho experimental do modelo de obesidade materna induzida por dieta.** A- Camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6J, com 4 semanas de idade, foram alimentadas com dieta controle (NC, 22% de energia proveniente de lipídeos) ou dietas hiperlipídicas (45% ou 60% de energia proveniente lipídeos na dieta, grupos HF45 e HF60, respectivamente) *ad libitum* durante 6 semanas consecutivas. Na 10ª semana de idade, as fêmeas foram acasaladas com machos em dieta controle, dando origem a geração F1. As fêmeas F0 permaneceram em suas respectivas dietas durante toda a gestação e lactação dos filhotes. Para aumentar a influência da dieta materna, na 10ª semana de idade, machos e fêmeas da geração F1 foram acasalados entre seu próprio grupo experimental para a obtenção da geração F2. Excetuando-se as fêmeas F0, todos os animais foram mantidos em dieta controle durante todo o protocolo experimental. As análises de composição corporal e tolerância à glicose foram realizadas nas gerações F1 e F2 nos tempos de 6, 10, 15 e 25 semanas de idade. O teste de campo aberto foi realizado na 15ª semana de idade e o ecocardiograma na 25ª semana de idade. Após o exame ecocardiográfico, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O coração foi dissecado e pesado. NC: dieta controle; MHF45: Prole advinda do grupo materno em HF45; MHF60: Prole advinda do grupo materno em HF60; RMN: ressonância magnética nuclear; TTG: teste de tolerância a glicose; CA: campo aberto; ECO: ecocardiograma; EUT: eutanásia.



**Figura 5: Desenho experimental do modelo de obesidade paterna induzida por dieta.** A- Camundongos machos da linhagem C57BL/6J, com 4 semanas de idade, foram alimentados com dieta controle (NC, 22% de energia proveniente de lipídeos) ou dietas hiperlipídicas (45% ou 60% de energia proveniente de lipídeos na dieta, grupos HF45 e HF60, respectivamente) *ad libitum* durante 6 semanas consecutivas. Na 10ª semana de idade, os machos foram acasalados com fêmeas em dieta controle, dando origem a geração F1. Para aumentar a influência da dieta paterna, na 10ª semana de idade, machos e fêmeas da geração F1 foram acasalados entre seu próprio grupo experimental para a obtenção da geração F2. Excetuando-se os machos F0, todos os animais foram mantidos em dieta controle durante todo o protocolo experimental. As análises de composição corporal e tolerância à glicose foram realizadas nas gerações F1 e F2 nos tempos de 6, 10, 15 e 25 semanas de idade. O teste de campo aberto foi realizado na 15ª semana de idade e o ecocardiograma na 25ª semana de idade. Após o exame ecocardiográfico, todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. O coração foi dissecado e pesado. NC: dieta controle; PHF45: Prole advinda do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole advinda do grupo paterno em HF60; RMN: ressonância magnética nuclear; TTG: teste de tolerância à glicose; CA: campo aberto; ECO: ecocardiograma; EUT: eutanásia.

### 4.3. Análise da composição corporal

O aparelho utilizado para a análise de composição corporal foi o *Echo MRI* (Houston, TX, USA), um instrumento de ressonância magnética nuclear que usa um magneto do tipo *gauss* e é adaptado ao estudo com pequenos animais, enquanto estes estão vivos e não-anestesiados.

Os animais destinados ao exame foram alocados na sala onde o *Echo MRI* encontrava-se, por pelo menos 30 minutos antes do início do procedimento, para permitir aclimatação. Em seguida, eles foram pesados e inseridos em um tubo Plexiglas de 63,5 cm de diâmetro e 20,3 cm de comprimento, fechado de um lado e coberto por uma tampa do lado oposto. O tubo é largo o suficiente para permitir movimentação limitada, como exploração vertical e rotação. O tubo é então inserido em um orifício circular vertical no magneto.

Durante a obtenção dos dados, o campo magnético foi impelido em gradientes através do animal e as flutuações desse campo magnético foi registrada. O camundongo permaneceu no tubo cerca de 1 a 3 minutos (duração aproximada do *scan*). Não há efeitos adversos registrados à exposição do animal sob esse campo magnético (KANGARLU & ROBITAILLE, 2000), o que permite que o animal seja escaneado por diversas vezes durante a vida.

Após o *scanner*, o camundongo foi liberado do tubo através da remoção da tampa e leve inclinação do tubo, permitindo que ele caminhasse livremente de volta para sua caixa. Entre cada animal, o tubo foi desinfetado com álcool 70% e, ao final da sessão, com o desinfetante Virkon.



#### 4.4. Análise da tolerância a administração intraperitoneal de glicose

O teste de tolerância a glicose (TTG) é uma prática comum no estudo do metabolismo glicídico em modelos animais. O TTG mensura o nível pelo qual a glicose é eliminada pela circulação sanguínea após sua administração.

Os camundongos foram mantidos em jejum entre 4 e 6 horas antes da injeção de solução de glicose 10%, administrada intraperitonealmente, na dosagem de 2 mg/ g de peso corporal do animal. Um pequeno corte na ponta da cauda do animal foi realizado para a coleta do sangue, nos tempos de 0 (imediatamente antes da injeção), 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração.

A glicose sérica foi mensurada com o auxílio do glicosímetro *Bayer Contour Next ONE Glucose System Wireless Meter* (Leverkusen, Alemanha). Os valores anotados foram utilizados na construção de uma curva de concentração de glicose ao longo de duas horas após a injeção de glicose. Ao final do procedimento, o corte foi desinfetado com álcool 70%, e os camundongos foram inseridos em uma caixa limpa, com acesso irrestrito a água e comida. A área sob a curva da glicemia ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) vs tempo (minutos) foi calculada com o auxílio do *Software GraphPad Prism®* versão 8.

#### 4.5. Análise comportamental

O teste de campo aberto (CA) é normalmente empregado em laboratório para medir o comportamento geral e respostas exploratórias em animais, como a atividade locomotora, hiperatividade, comportamentos repetitivos e respostas análogas a ansiedade. É geralmente utilizada como triagem inicial para visualização de alterações comportamentais, que serão melhor analisadas posteriormente, com testes comportamentais complementares. Para este trabalho, o propósito do campo aberto foi a caracterização comportamental basal. Tais experimentos foram feitos em colaboração com o [Laboratório O'Connell](#) pelo pós-doutor Austin Korgan, sob orientação da professora auxiliar Kristen M. S. O'Connell no *The Jackson Lab* (Maine, USA), durante o período de Doutorado Sanduíche previamente mencionado.

Os camundongos foram levados à sala de procedimentos pelo menos 30 minutos antes do início do teste, onde foram analisados individualmente na câmara, por sessão. As sessões duraram 10 minutos, tempo suficiente para a aclimação do animal, observada pelo aumento do comportamento exploratório seguido de descanso, seguindo protocolo adaptado de KORGAN e colaboradores (2018).

No início do teste, o animal foi posicionado no centro da câmara e o computador iniciou a gravação. O aparato utilizado foi uma câmara quadrada Plexiglass, de dimensões de 55,8 cm × 55,8 cm × 35,6 cm (largura × comprimento × altura) feita de plástico e iluminada a partir do centro do campo aberto com lâmpada branca.

Um gerador de ruído branco (*San Diego Instruments*, Part# 2325-0144) foi utilizado para minimizar o impacto negativo que barulhos externos poderiam ter no ensaio comportamental. Tal ruído branco foi mantido em um volume de 75 dba no centro do campo aberto, um procedimento necessário para bloquear ruídos das salas vizinhas, cerca de 20 dba acima do nível de ruído da sala de aclimação, quando o gerador está desligado. Tal volume e duração de ruído não causa danos na audição nem constitui um estressor fisiológico ou estímulo ansiolítico em roedores (DEACON, 2006). Ao final da sessão, os camundongos retornaram às suas caixas e, entre animais, a arena de testes foi desinfetada com solução de hipoclorito de sódio 10%.

Os dados foram obtidos através do sistema de vídeo *LimeLight* (Actimetrics Inc, Illinois, USA). As medidas de distância total percorrida (cm), onde e por quanto tempo o animal ficou (centro, perímetro ou cantos) foram automaticamente analisadas. Informações adicionais de comportamento podem ser obtidas através da visualização posterior do mesmo, como o número de explorações verticais (*rearing*, quando o animal se apóia nos membros posteriores) ou de comportamentos específicos, como o congelamento (*freezing*, caracterizado pela imobilidade por 2 ou mais segundos do animal, enquanto acordado) e o autocuidado (*grooming*, quando o animal lambe, mordisca ou combina ações voltadas ao cuidado com o pelo, por 2 ou mais segundos).

Os dados automáticos foram analisados em animais F0, F1 e F2. Informações adicionais de *grooming* foi obtido para as fêmeas F0, como medida indireta de estresse antes do acasalamento. Foi avaliado o tempo que os animais da prole F1 e F2, obtida da obesidade paterna, gastaram nos comportamentos de *rearing* e *freezing*. Comportamentos específicos dos machos da F0 assim como a prole obtida da obesidade materna ainda serão analisados.

#### **4.6. Análise da função cardíaca**

Na 25<sup>a</sup> semana de idade, os animais das proles advindas da obesidade materna e paterna foram submetidos à anestesia inalatória de isoflurano (Isoforine®, Cristália), na concentração de 4% e em fluxo de 1L/min de oxigênio. Após o estabelecimento de um bom plano anestésico, verificados pela ausência de reflexos motores e protetores, os animais foram tricotomizados na região torácica ventral, com auxílio de loção depilatória hipoalergênica e posteriormente examinados através do aparelho *Vevo 2100® High-Resolution Imaging System* (FUJIFILMS Visualsonics), com transdutor específico para pequenos roedores.

Foram confeccionadas fotos dos axis longo paraesternal e curto, ao nível dos músculos papilares, nos modos B e M. O método escolhido para análise da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) (%), bem como dos volumes diastólico e sistólico final do ventrículo esquerdo ( $\mu\text{L}$ ) foi o método de Simpson, associado a validações deste parâmetro pelo *LV trace*.

#### 4.7. Análise estatística

Para avaliar se os dados seguem a distribuição normal, foi feito o teste de normalidade Shapiro-Wilk. Para a identificação de dados com grande dispersão (*outliers*), foi feito o teste de Grubbs. Todos os dados obtiveram distribuição normal, portanto foi utilizado o teste T de *Student* (em até dois grupos) ou *One way* ANOVA seguido de Tukey (nas avaliações de resultados obtidos através do RMN e TTG) ou Sidak (resultados referentes ao campo aberto) *post hoc* (para mais de dois grupos), com auxílio do *Software* GraphPad Prism® versão 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM), sendo diferença significativa quando (\*)  $p < 0,05$ ; (\*\*)  $p < 0,01$ ; (\*\*\*)  $p = 0,001$  e (\*\*\*\*)  $p < 0,001$ .

## 5. RESULTADOS

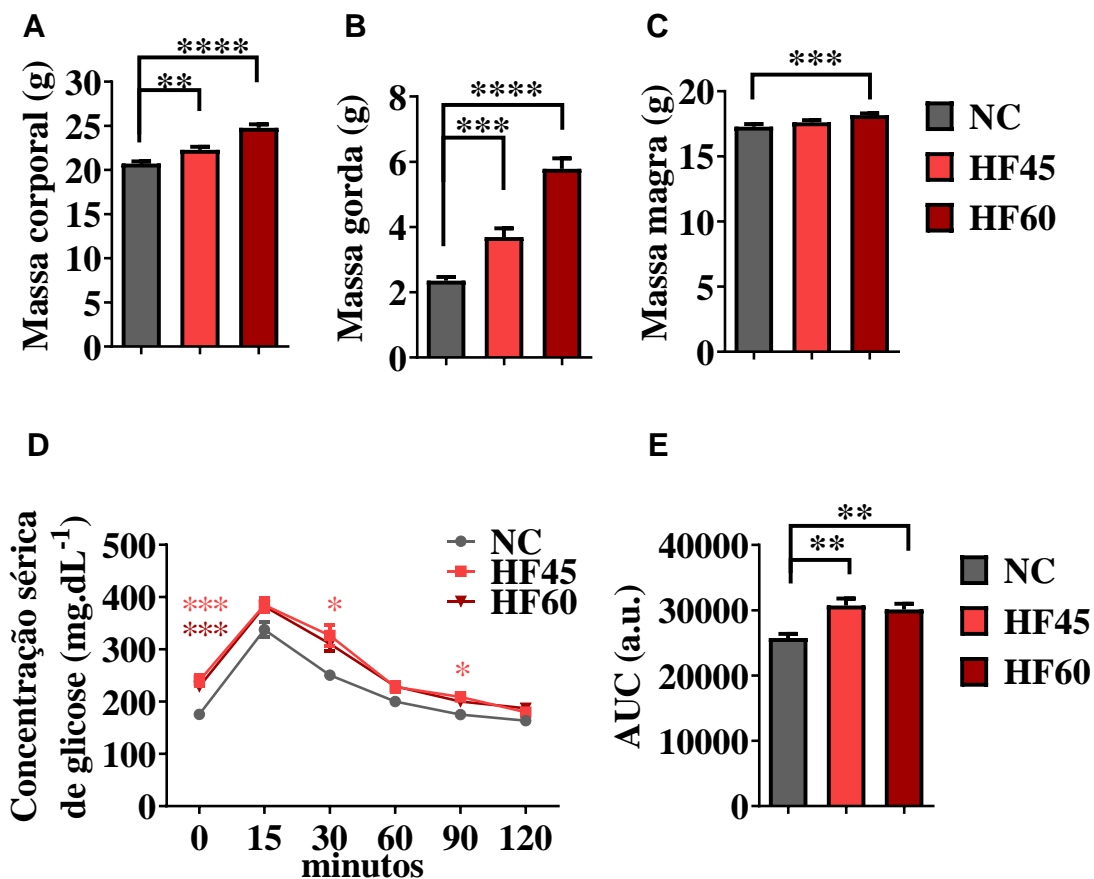
### 5.1. Análise metabólica e comportamental das fêmeas F0 antes do acasalamento

#### 5.1.1. Análise metabólica

Para avaliar a condição metabólica das matrizes antes do acasalamento com machos não obesos, fêmeas dos grupos NC, HF45 e HF60 foram submetidas ao exame de ressonância magnética nuclear e ao teste de tolerância a glicose após a 6ª semana de fornecimento de dieta hiperlipídica.

Ao avaliar a massa corporal, observamos que fêmeas HF45 e HF60 apresentaram aumento de 8% e 20%, respectivamente (Figura 6A). Tal alteração foi acompanhada pelo aumento no teor de massa gorda, cerca de 57% no grupo HF45 e 1,5x nas fêmeas HF60 (Figura 6B). Somente as fêmeas HF60 apresentaram aumento (5%) na massa magra, em comparação ao grupo NC (Figura 6B).

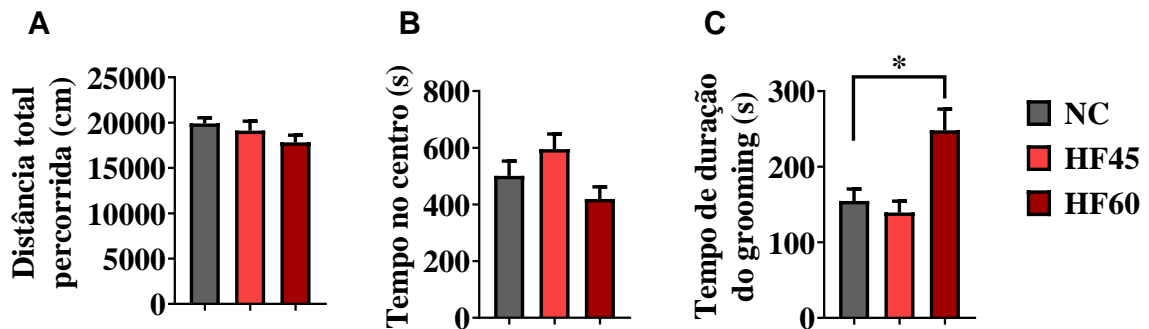
O metabolismo glicídico foi avaliado através do TTG. Neste teste, é possível correlacionar a concentração sérica de glicose com o tempo decorrido desde que a glicose foi administrada. Se o organismo elimina a glicose de forma eficiente, as concentrações de glicose serão reduzidas rapidamente e a área sob a curva da glicemia vs tempo será menor. Caso o metabolismo glicídico esteja comprometido, haverá prejuízo na redução da concentração sérica de glicose, que será mais lenta. Dessa forma, maiores serão as concentrações de glicose observadas durante todo o teste e maior será a área sob a curva. Nas fêmeas em dieta hiperlipídica, observamos aumento da área sob a curva entre os grupos experimentais, de cerca de 20% em ambos os grupos HF45 e HF60 (Figura 6E). Os valores numéricos da composição corporal e área sob a curva encontram-se na tabela 1 do Anexo A.



**Figura 6: Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos fêmeas, após 6 semanas de fornecimento de dietas hiperlipídicas.** Na primeira linha, observamos a avaliação através do RMN em fêmeas de 10 semanas de idade. A- Massa corporal (g); B- Massa gorda (g) e; C- Massa magra (g); n= 31-35 animais/ grupo; Na segunda linha, observamos os resultados do TTG em fêmeas de 10 semanas de idade. D- Curva de concentração sérica de glicose (mg.dL<sup>-1</sup>) e, E- Valores referentes às áreas sobre a curva dos grupos experimentais (unidades arbitrárias); n= 8-13 animais/ grupo. NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% de energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% de energia proveniente de lipídeos. AUC: área sobre a curva. Os resultados são expressos como média ± SEM. *One way ANOVA, Tukey post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p = 0,001; \*\*\*\*p < 0,001; NC vs HF45 ou HF60.

### 5.1.2. Análise comportamental

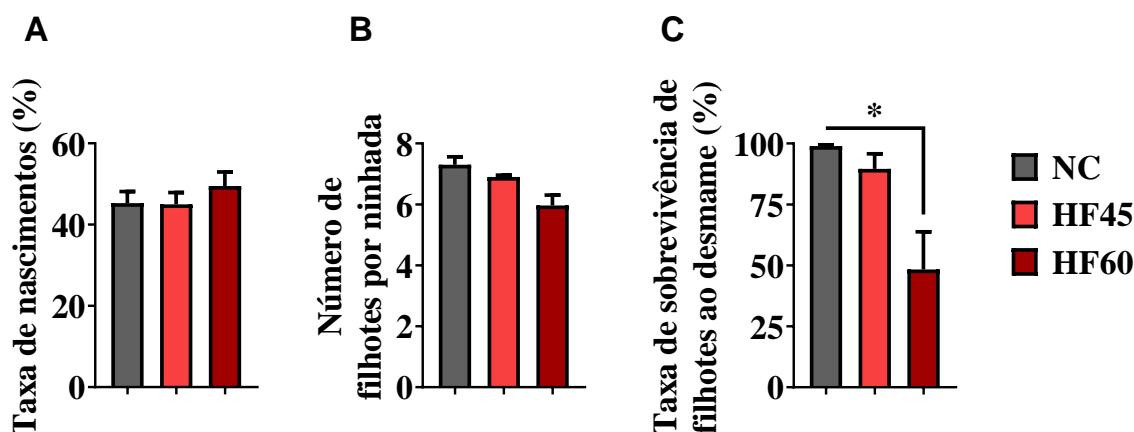
Para avaliar se o consumo de dieta hiperlipídica poderia alterar parâmetros comportamentais das fêmeas antes do acasalamento foi realizado o teste do campo aberto (CA). Ao avaliar a distância total percorrida (Figura 7A) e o tempo de permanência no centro da plataforma (Figura 7B), nenhuma alteração foi observada entre os grupos experimentais. No entanto, o tempo utilizado pelas fêmeas HF60 realizando o *grooming*, foi maior em cerca de 60% quando comparado ao grupo NC (Figura 7C). Esses dados estão representados graficamente na figura 7, e os valores numéricos encontram-se na tabela 2 do Anexo A.



**Figura 7: Avaliação comportamental obtida através do teste de campo aberto, em fêmeas de 10 semanas de idade.** A- Distância total percorrida (cm); B- Tempo no centro do campo aberto (segundos) e, C- Tempo de duração do *grooming* (segundos). NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% de energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% de energia proveniente de lipídeos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 13-18 animais/ grupo; *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; NC vs HF60.

Para avaliar se a obesidade materna estaria influenciando a capacidade reprodutiva das fêmeas, avaliamos a taxa de nascimento, o número de filhotes por ninhada e a taxa de sobrevivência dos filhotes ao final da lactação. A taxa de nascimento foi calculada dividindo-se o número de fêmeas que conceberam ninhadas pelo número total de fêmeas. O número de filhotes por ninhada foi obtido a partir da contagem de filhotes observados ao nascimento de ninhadas. A taxa de sobrevivência dos filhotes após a lactação foi calculada dividindo-se o número de filhotes após a lactação por 6 (número de filhotes deixados com cada matriz após o nascimento).

Não foram observadas diferenças significativas na taxa de nascimento (Figura 8A) nem no número de filhotes por ninhada (Figura 8B) entre os grupos experimentais. Ao analisar a taxa de sobrevivência dos filhotes após a lactação, no entanto, observamos que as fêmeas HF60 apresentaram redução desse parâmetro em quase 50%, quando comparadas às fêmeas do grupo controle (Figura 8C). Esses dados estão representados graficamente na figura 8, e os valores numéricos encontram-se na tabela 3 do Anexo A.



**Figura 8: Parâmetros observados nas matrizes durante a gestação e lactação dos filhotes.** O percentual de fêmeas que conceberam, em relação ao número total de fêmeas no experimento, está descrito como: A- Taxa de nascimento (%); B- Número de filhotes por ninhada; e C- Taxa de sobrevivência de filhotes ao final da lactação (%). NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% de energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% de energia proveniente de lipídeos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 13-18 animais/ grupo; *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; NC vs HF60.

## 5.2. Análise metabólica, comportamental e cardíaca da prole de fêmeas obesas

Para evitar a ocorrência de ninhadas heterogêneas, 6 filhotes por ninhada foram mantidos com a matriz até o final da lactação, aos 21 dias de idade. Ao final da lactação, sempre que possível, um ou dois animais de cada sexo foram separados para a avaliação de RMN e TTG, e para o ecocardiograma no final da 25ª semana de idade. Outro casal era destinado unicamente para o CA, realizado na 15ª semana de idade.

### 5.2.1. Análise metabólica

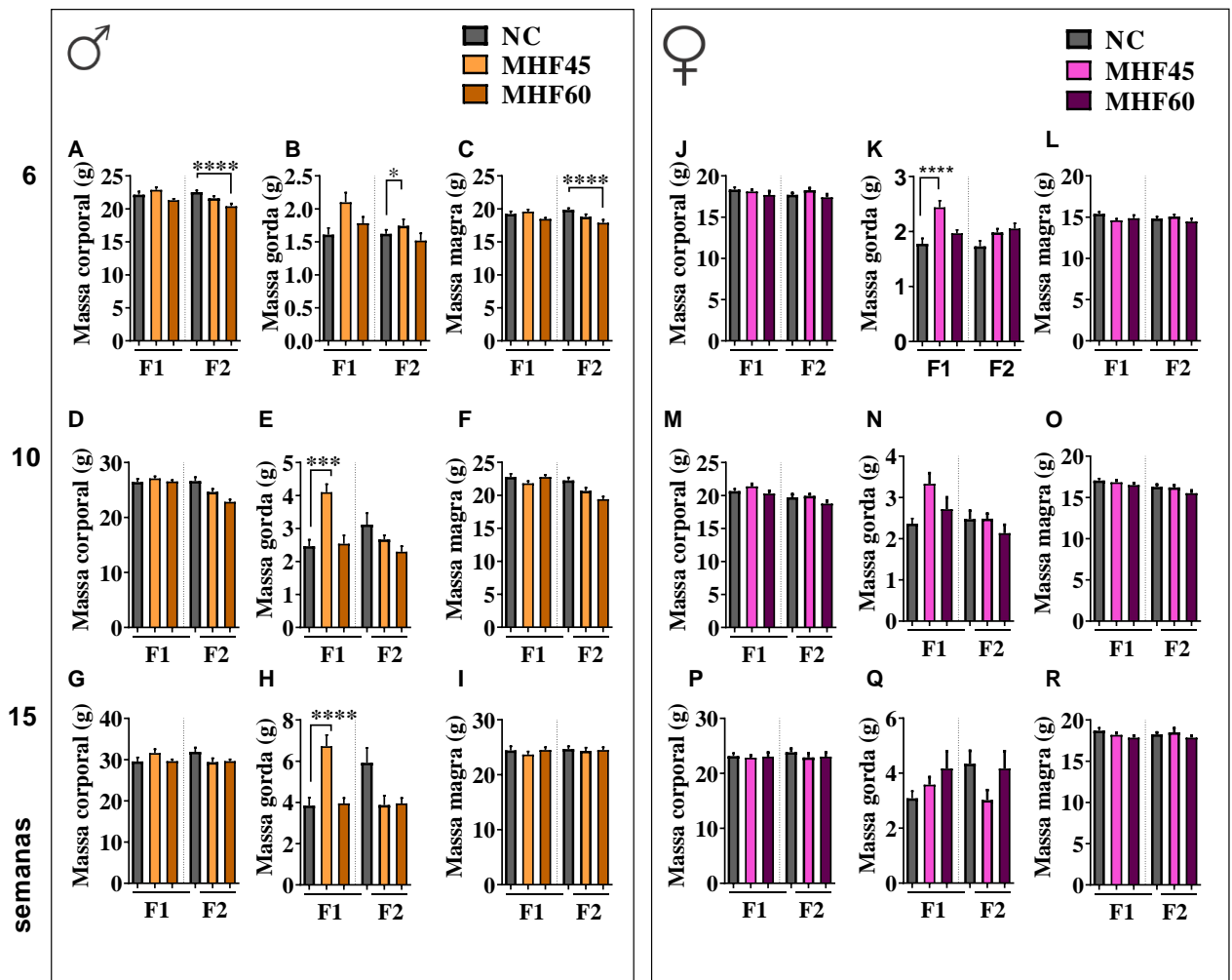
Os valores obtidos na RMN compreendem a massa corporal, massa gorda e massa magra dos animais das proles NC, MHF45 e MHF60 de ambas as gerações F1 e F2, nas idades de 6, 10, 15 e 25 semanas.

Nos filhotes machos, ao analisar a massa corporal dos indivíduos, observamos aumento de 12% somente na prole F1-MHF45 na 25ª semana de idade (Figura 10A). Em relação a F2, a alteração observada foi a redução da massa corporal em 4%, na prole F2-MHF60 (6 semanas de idade) (Figura 9A) e de 9% na prole F2-MHF45, na 25ª semana de idade (Figura 10A).

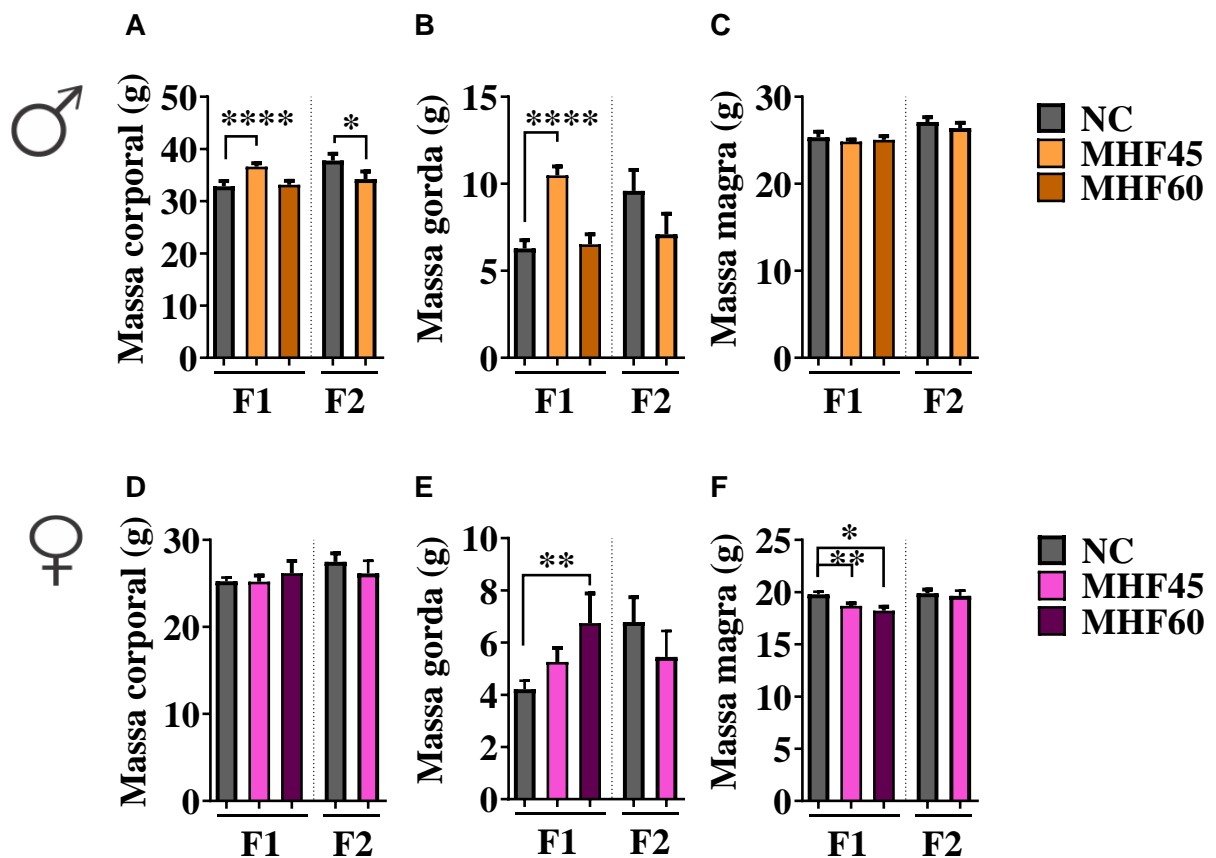
Em relação a massa gorda, a prole MHF45 foi a única que apresentou diferença significativa. Percebeu-se aumento do conteúdo de massa gorda na F1-MHF45 desde a 10ª até a 25ª semana de idade, sendo porcentagens de 63%, 75% e 67% na 10ª, 15ª e 25ª semana, respectivamente (Figuras 9E, 9H e 10B, respectivamente). Já a prole F2-MHF45 apresentou aumento de massa gorda na 6ª semana de idade (7%), de forma transitória (Figura 9B). Quanto a massa magra, nenhuma alteração foi observada na geração F1 (Figuras 9C, 9F, 9I, 10C). Na F2, houve redução de 10% na massa magra da prole F2-MHF60, somente na 6ª semana, sendo esse parâmetro normalizado conforme o crescimento do animal (Figura 9C). Os valores de massa corporal, massa gorda e massa magra estão representados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. A representação gráfica dos dados encontra-se nas figuras 9 (6, 10 e 15 semanas de idade) e 10 (25 semanas de idade) e a descrição dos valores numéricos encontra-se na tabela 4 do Anexo A.

Nas fêmeas, nenhuma alteração significativa de massa corporal foi observada ao longo de todo o experimento (Figuras 9J, 9M, 9P e 10D). Em relação ao conteúdo de massa gorda, somente as fêmeas F1-MHF45 apresentaram aumento de 37% na 6ª semana de idade (Figura 9K), enquanto as fêmeas F1-MHF60 apresentaram aumento de 60% de massa gorda na 25ª semana de idade (Figura 10E), em relação ao grupo F1-NC. E, em relação a massa magra, alterações foram observadas somente na 25ª semana de idade, onde fêmeas F1-MHF45 e F1-MHF60 apresentaram redução desse parâmetro em 6% e 8%, respectivamente (Figura 10F). Os valores de massa corporal, massa gorda e massa magra estão representados nas tabelas 1, 2 e 3, respectivamente. A representação gráfica dos dados encontra-se nas figuras 9 (6, 10 e 15 semanas de idade) e 10 (25 semanas de idade) e a descrição dos valores numéricos encontra-se na tabela 4 do Anexo A.





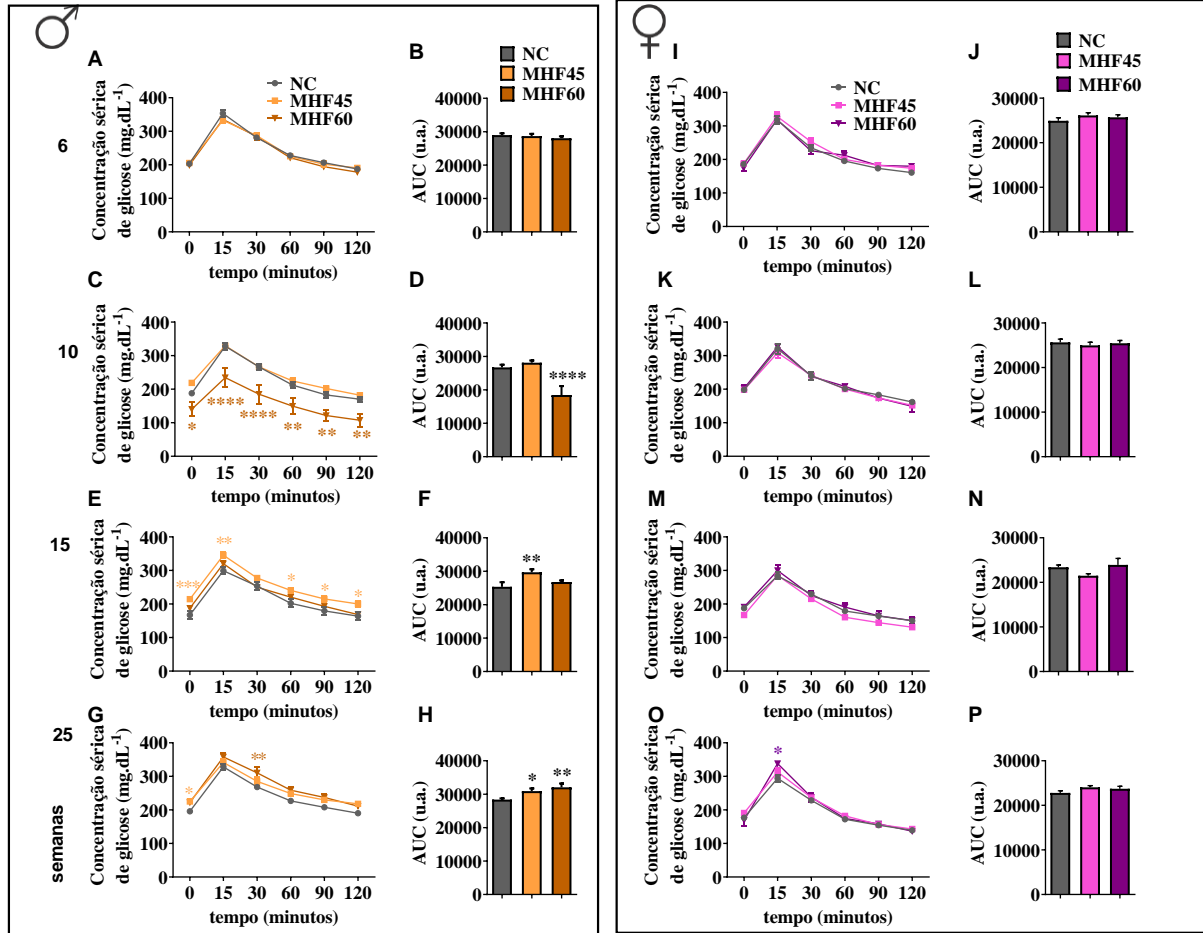
**Figura 9:** Análise da evolução da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta. Os parâmetros de composição corporal dos filhotes machos (laranja) e fêmeas (rosa) estão listados da seguinte maneira: da esquerda para a direita, os valores referentes a massa corporal (g), massa gorda (g) e massa magra (g). De cima para baixo, vemos a evolução de tais parâmetros nas idades de 6, 10 e 15 semanas. Os dados referentes à composição corporal dos machos encontram-se nos gráficos A-I, enquanto que os dados de filhotes fêmeas estão representados nos gráficos J-R. Observamos que, apesar da massa corporal ser a mesma entre os grupos experimentais, há maior conteúdo de massa gorda nos filhotes machos da F1-MHF45 a partir da 10ª semana de idade (B, E, H), sem alterações significativas na proporção de massa magra (C, F, I); tais observações não são mantidas na F2-MHF45. Na F2, alterações observadas foram restritas à 6ª semana de idade: machos da F2-MHF60 apresentaram menor massa corporal (A) decorrente de menor massa magra (C), enquanto que a prole F2-MHF45 apresentou leve aumento de massa gorda (B), sem que haja alterações de massa corporal (A). Nas fêmeas, não foram observadas alterações proeminentes na composição corporal (J-R). A única alteração observada foi o aumento transitório de massa gorda (K), sem alteração de massa corporal (J), da prole F1-MHF45, restrita a 6ª semana de idade. NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 4-26 animais/ grupo; *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\*\* p = 0,001; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs MHF45 ou MHF60.



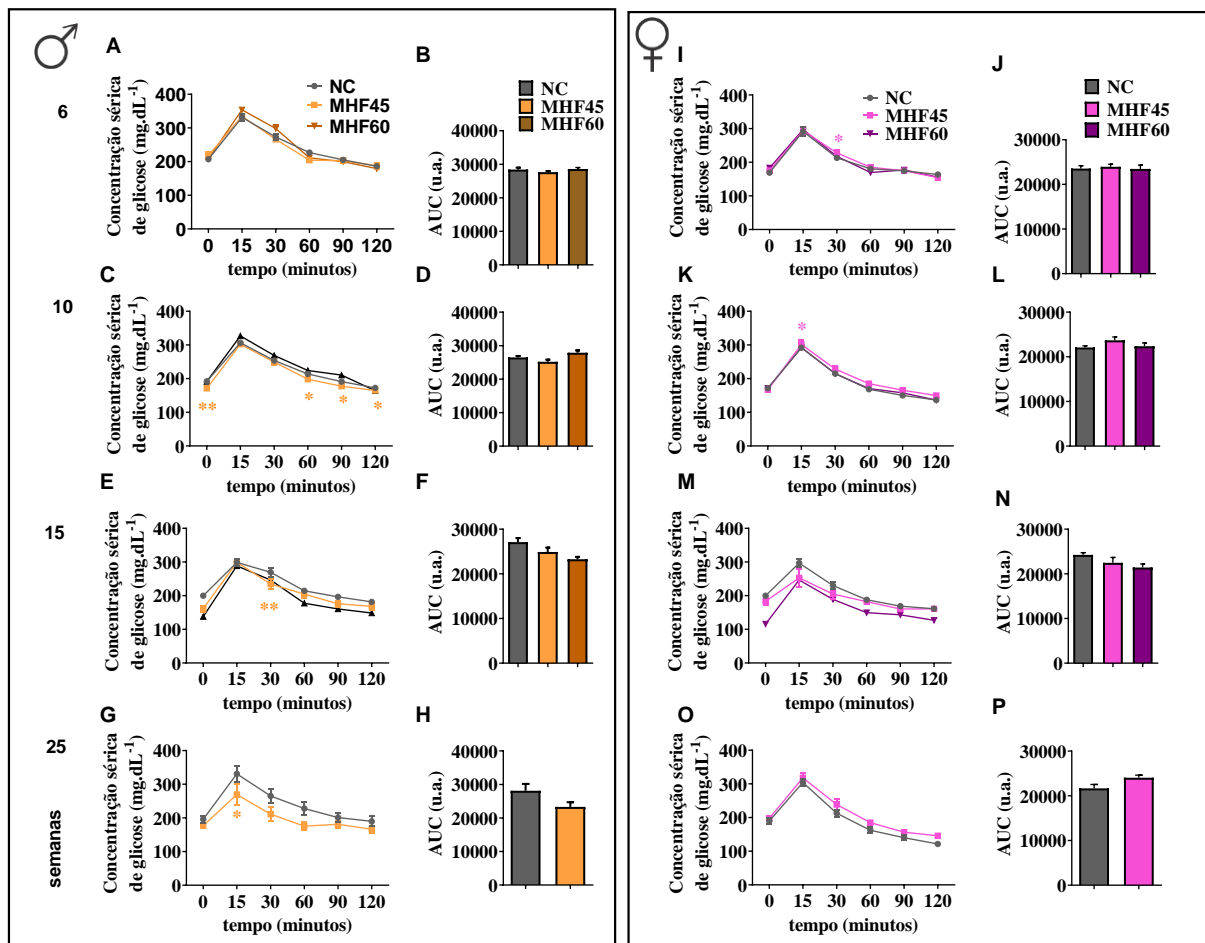
**Figura 10: Análise da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta na 25ª semana de idade.** Representação gráfica da massa corporal (g), massa gorda (g) e massa magra (g), respectivamente, dos filhotes machos (Gráficos A, B e C, em laranja, respectivamente) e fêmeas (Gráficos D, E e F, em rosa, respectivamente). A análise da composição corporal ao final do experimento na prole macho demonstrou que, na F1, a prole macho F1-MHF45 apresenta aumento de massa corporal (A) associado ao acúmulo de massa gorda (B). Em relação a F2, observamos redução de massa corporal (A) em machos F2-MHF45. Quanto à análise da composição corporal na prole fêmea, não foram observadas alterações na massa corporal (D) em ambas as gerações. Na F1, o acúmulo de massa gorda (E) foi acompanhado pela redução de massa magra (F) na prole F1-MHF60, enquanto na F1-MHF45 observamos leve redução na massa magra (F); tais observações não foram transmitidas para a geração subsequente. NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 4-28 animais/ grupo; Teste t ou *One way* ANOVA, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs MHF45 ou MHF60.

O TTG foi realizado em todos os grupos experimentais (NC, MHF45 e MHF60, F1 e F2), durante os tempos de 6, 10, 15 e 25 semanas de idade. Observamos que a obesidade materna foi capaz de alterar esse fenótipo somente em machos da geração F1 (Figura 11A-H). Os filhotes machos da prole F1-MHF60 apresentaram melhora do metabolismo glicídico de forma temporária (Figura 11C), na 10ª semana de idade, caracterizada pela redução de 31% nos valores obtidos da AUC (Figura 11D). Em contrapartida, filhotes machos da prole F1-MHF45 apresentaram prejuízo na eliminação de glicose sanguínea desde a 15ª até a 25ª semana de idade, em proporções de 17% e 9%, respectivamente (Figuras 11E-H). Nenhuma

alteração significativa neste parâmetro foi observada nos machos da geração F2 (Figura 12A-H). Em relação aos filhotes fêmeas, a obesidade materna não gerou nenhuma mudança no metabolismo glicídico, seja na geração F1 (Figura 11I-P) ou F2 (Figura 12I-P). A representação gráfica dos dados mencionados de machos e fêmeas, em todos os tempos estudados da geração F1 encontram-se na figura 11, e os da geração F2, na figura 12.



**Figura 11: Análise da tolerância a glicose intraperitoneal de filhotes machos (laranja) e fêmeas (rosa) da primeira geração (F1) de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, nas idades de 6, 10, 15 e 25 semanas.** Da esquerda para a direita, estão listados a curva de concentração sérica de glicose ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) ao longo de 2 horas após a administração em *bolus* intraperitoneal de glicose e valores de área sob a curva (AUC, unidades arbitrárias). De cima para baixo, a evolução ao longo das idades de 6, 10, 15 e 25 semanas. Os dados da prole macho estão representadas nos gráficos A-H. Observamos melhor tolerância a glicose na prole macho F1-MHF60 na 10ª semana de idade (C e D), e uma piora desse parâmetro ao final do protocolo experimental, na 25ª semana de idade (G e H). Machos F1-MHF45 apresentaram redução da tolerância a glicose desde a 15ª semana de idade (E e F) até o final do experimento (E-H). Os dados da prole fêmea estão representados nos gráficos I-P. Nenhuma alteração significativa neste fenótipo foi observada nos filhotes fêmeas (I-P). NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM;  $n = 4-27$  animais/ grupo; *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; NC vs MHF45 ou MHF60.



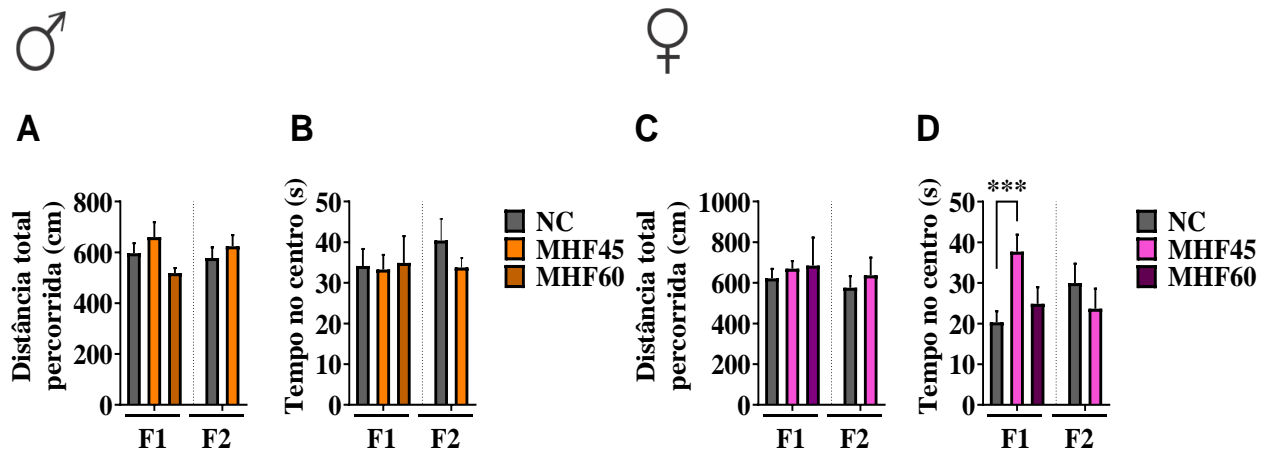
**Figura 12: Análise da tolerância a glicose intraperitoneal de filhotes machos (laranja) e fêmeas (rosa) da segunda geração (F2) de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, nas idades de 6, 10, 15 e 25 semanas.** Da esquerda para a direita, estão listados a curva de concentração sérica de glicose ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) ao longo de 2 horas após a administração em *bolus* intraperitoneal de glicose e valores de área sob a curva (AUC, unidades arbitrárias). De cima para baixo, a evolução ao longo das idades de 6, 10, 15 e 25 semanas. Os dados da prole macho estão representadas nos gráficos A-H, enquanto o das fêmeas estão representados nos gráficos I-P. Nenhuma alteração significativa neste fenótipo foi observada na F2, independente do sexo do filhote. NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM;  $n= 6-37$  animais/grupo; Teste *t de Student* ou *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; NC vs MHF45 ou MHF60.

### 5.2.2. Análise comportamental

Para analisar se a obesidade materna foi capaz de alterar o comportamento da prole, o teste de CA foi realizado. A distância total percorrida e o tempo de permanência no centro da plataforma pelos filhotes machos das gerações F1 e F2 não foram alterados pela obesidade materna (Figura 13A, 13B).

Em relação aos filhotes fêmeas, nenhuma alteração na distância percorrida foi observada em ambas as gerações (Figura 13C). No entanto, filhotes fêmeas do grupo F1-MHF45 apresentaram aumento (86%) no tempo de permanência no centro do campo aberto (Figura 13D). Tal alteração, no entanto, não foi transmitida para a geração subsequente (F2), neste modelo experimental.

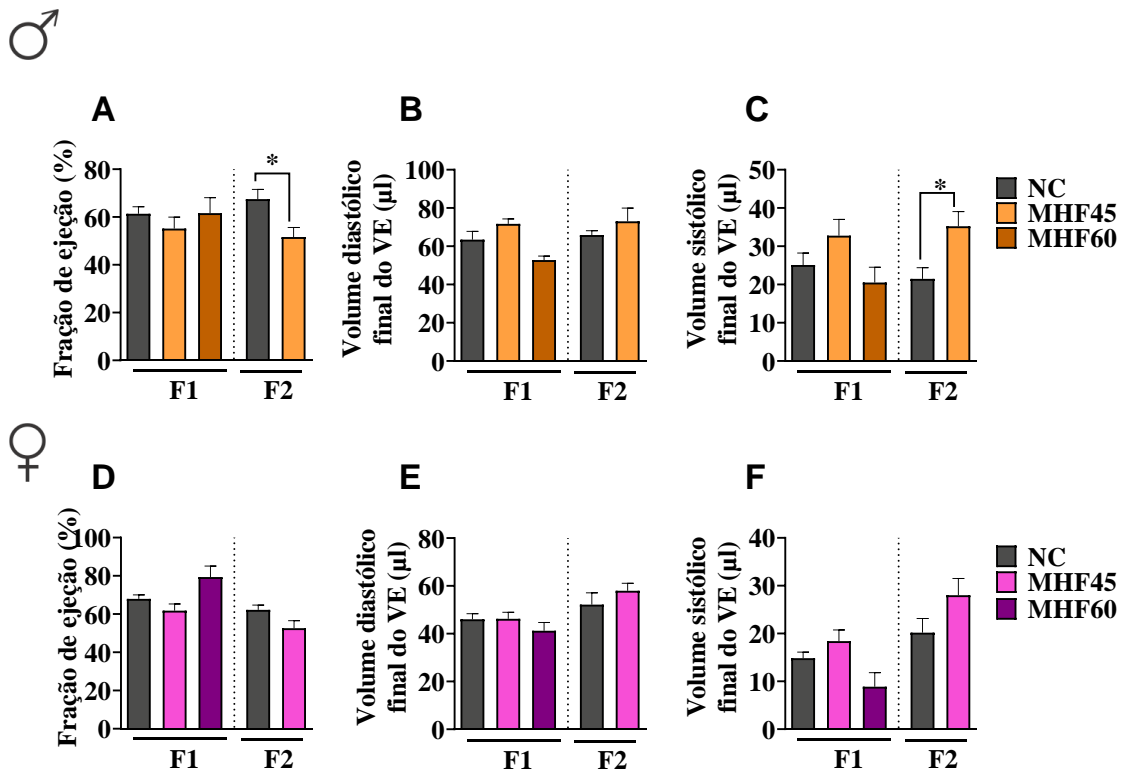
A representação gráfica dos dados mencionados encontra-se na figura 13, e os valores numéricos na tabela 7 do Anexo A.



**Figura 13: Análise comportamental da prole macho (laranja) e fêmea (rosa) de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta na 15ª semana de idade, através do teste de campo aberto, por duas gerações subsequentes.** As representações gráficas indicam, da esquerda para a direita, a distância total percorrida (cm) e o tempo no centro do campo aberto (segundos). Observamos que os machos não apresentaram qualquer alteração fenotípica nas medidas avaliadas (A e B). As fêmeas não apresentaram qualquer alteração na distância total percorrida (C), mas fêmeas F1-MHF45 apresentaram aumento do tempo percorrido no centro (D), sem que haja transmissão dessa característica para a geração F2. NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 4-13 animais/ grupo; Teste t ou *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*; \*\*\* p = 0,001; NC vs MHF45 ou MHF60.

### 5.2.3. Análise da função cardíaca

Para avaliar se a função cardíaca pode ser modulada pela obesidade materna ao longo de duas gerações consecutivas, o exame ecocardiográfico foi realizado na 25<sup>a</sup> semana de idade dos animais. Não observamos alteração na função cardíaca de animais machos na geração F1 (Figura 14A-C). Surpreendentemente, na geração F2, machos F2-MHF45 apresentaram redução de 24% na fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Figura 14A), associada ao aumento no volume sistólico final de 64% (Figura 14C). Em relação aos filhotes fêmeas, nenhuma alteração na função cardíaca foi observada na prole fêmea, tanto na geração F1 quanto na F2 (Figura 14D-F). Tais dados sugerem importante deficiência na função cardíaca sistólica. Tais dados estão representados graficamente da figura 14, e os valores numéricos correspondentes encontram-se nas tabelas 7 (Geração F1) e 8 (Geração F2) do Anexo A.



**Figura 14: Análise da função cardíaca de filhotes machos (laranja) e fêmeas (rosa) provenientes de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25<sup>a</sup> semana de idade, das proles F1 e F2.** Gráficos relativos aos filhotes machos: A- Fração de ejeção (%), B- Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (µL), e C- Volume sistólico final do ventrículo esquerdo. Observamos que a prole F1 não apresentou nenhuma alteração nos parâmetros demonstrados. Na F2, filhotes machos da prole F2-MHF45 apresentaram redução da fração de ejeção (A) associada ao aumento do volume sistólico final do ventrículo esquerdo (C). Gráficos relativos aos filhotes fêmeas: D- Fração de ejeção (%), E- Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (µL), e F- Volume sistólico final do ventrículo esquerdo (µL). Nenhuma alteração significativa foi observada nas gerações F1 e F2. NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 3-16 animais/ grupo; Teste *t de Student* ou *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; NC vs MHF45 ou MHF60.

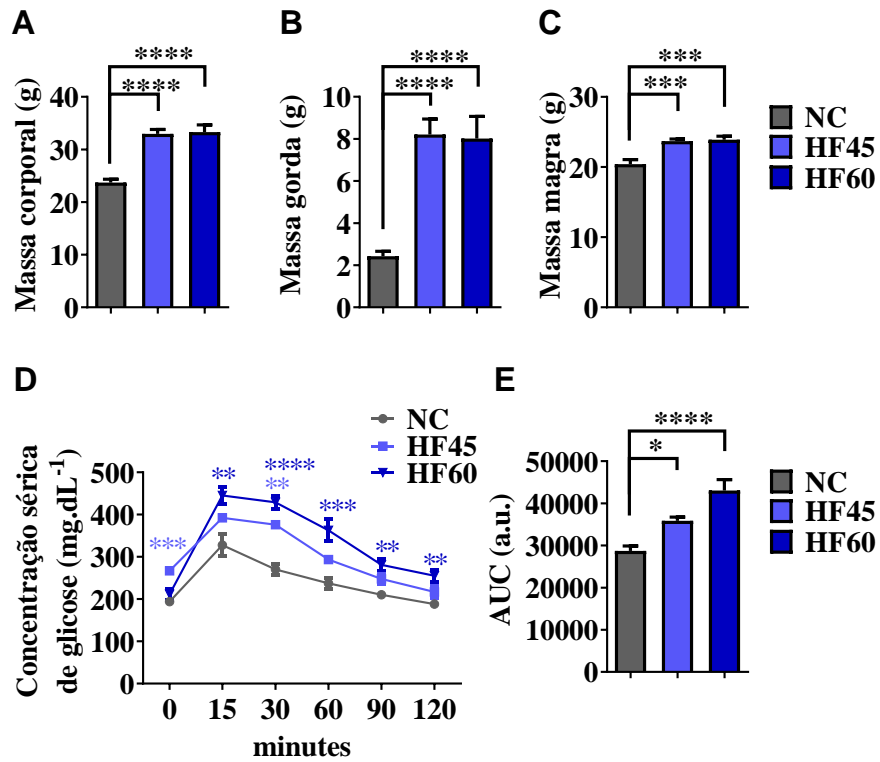
### **5.3. Análise metabólica e comportamental dos machos F0 antes do acasalamento**

#### **5.3.1. Análise metabólica**

Para avaliar a condição metabólica dos machos antes do acasalamento com fêmeas não obesas, os grupos NC, HF45 e HF60 foram submetidos ao exame de RMN e ao TTG após a 6ª semana de fornecimento de dieta hiperlipídica.

Em relação a massa corporal dos animais, observamos que machos HF45 e HF60 apresentaram aumento de 39% e 40%, respectivamente (Figura 15A) em comparação ao grupo NC. Tal alteração foi acompanhada pelo aumento de massa gorda, cerca de 2,4x nos machos HF45 e 2,3x no grupo HF60 (Figura 15B). A massa magra também estava aumentada em ambos os grupos HF45 (16%) e HF60 (17%), em comparação ao grupo NC (Figura 15C).

Quanto ao metabolismo de glicose, no TTG foi observado o aumento da área sob a curva de 25% e 50% nos grupos HF45 e HF60, respectivamente (Figura 15D-E). Os valores referentes aos dados acima podem ser encontrados na tabela 1 do Anexo B.

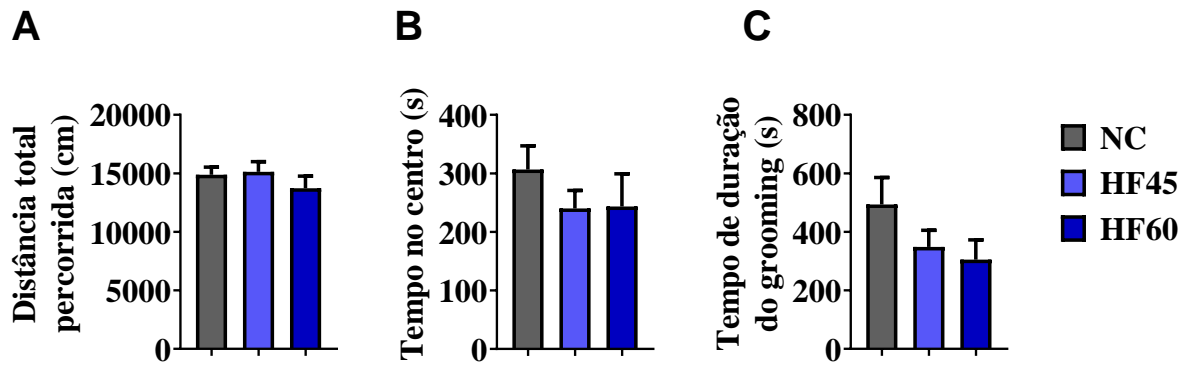


**Figura 15: Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos machos, após 6 semanas de fornecimento de dieta hiperlipídica.** A- Avaliação através do RMN em machos de 10 semanas de idade. A- Massa corporal (g); B- Massa gorda (g) e; C- Massa magra (g). TTG em machos de 10 semanas de idade. D- Curva de concentração sérica de glicose (mg.dL<sup>-1</sup>) e, E- as respectivas áreas sobre a curva dos grupos experimentais (unidades arbitrárias). NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% da energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% da energia proveniente de lipídeos. AUC: área sobre a curva. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 5-12 animais/ grupo; *One way ANOVA*, *Tukey post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p = 0,001; \*\*\*\*p < 0,001; NC vs HF45 ou HF60.



### 5.3.2. Análise comportamental

Para avaliar se o consumo de dieta hiperlipídica poderia alterar parâmetros comportamentais dos machos antes do acasalamento foi realizado o teste de campo aberto. Nenhuma alteração foi observada nos parâmetros de distância total percorrida (Figura 16A), no tempo de permanência no centro (Figura 16B) e no tempo de *grooming* (Figura 16C) entre os grupos experimentais. Os valores numéricos para esses resultados encontram-se na tabela 2 do Anexo B.



**Figura 16: Análise comportamental de camundongos machos submetidos ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta antes do acasalamento.** Avaliação comportamental obtida através do teste de campo aberto, em machos de 10 semanas de idade, após 6 semanas de consumo de dieta hiperlipídica. A- Distância total percorrida (cm); B- Tempo no centro do campo aberto (segundos) e, C- Tempo de duração do *grooming* (segundos). NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% da energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% da energia proveniente de lipídeos. AUC: área sobre a curva. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 7-9 animais/ grupo; *One way* ANOVA, Sidak *post hoc*.

#### **5.4. Análise metabólica, comportamental e cardíaca da prole dos machos obesos**

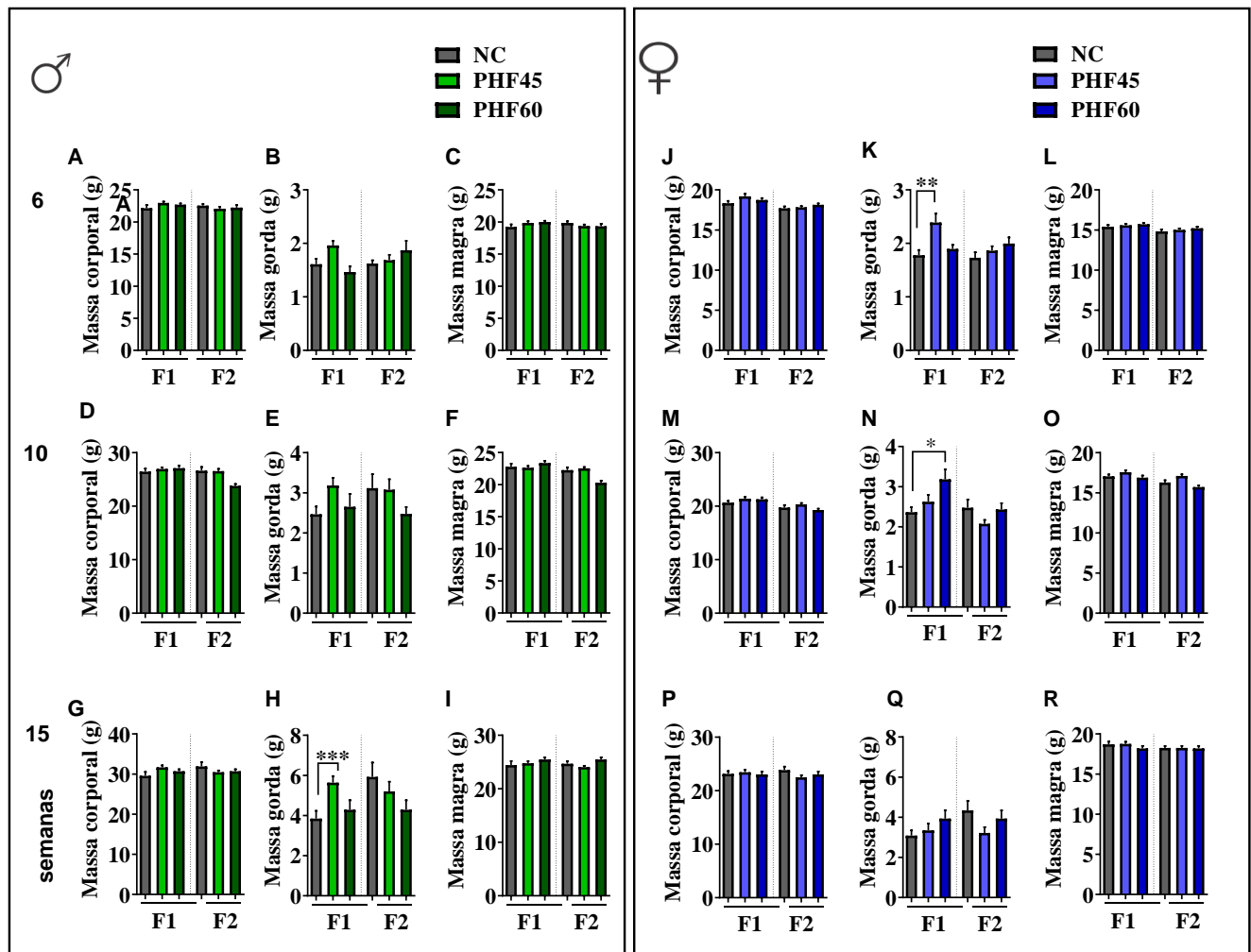
A fim de evitar a ocorrência de ninhadas heterogêneas, 6 filhotes por ninhada foram mantidos com a matriz até o final da lactação, aos 21 dias de idade. Ao final da lactação, sempre que possível, um ou dois animais de cada sexo foram separados para a avaliação de RMN e TTG, e para o ecocardiograma no final da 25ª semana de idade. Outro casal era destinado unicamente para o CA, realizado na 15ª semana de idade.

##### **5.4.1. Análise metabólica**

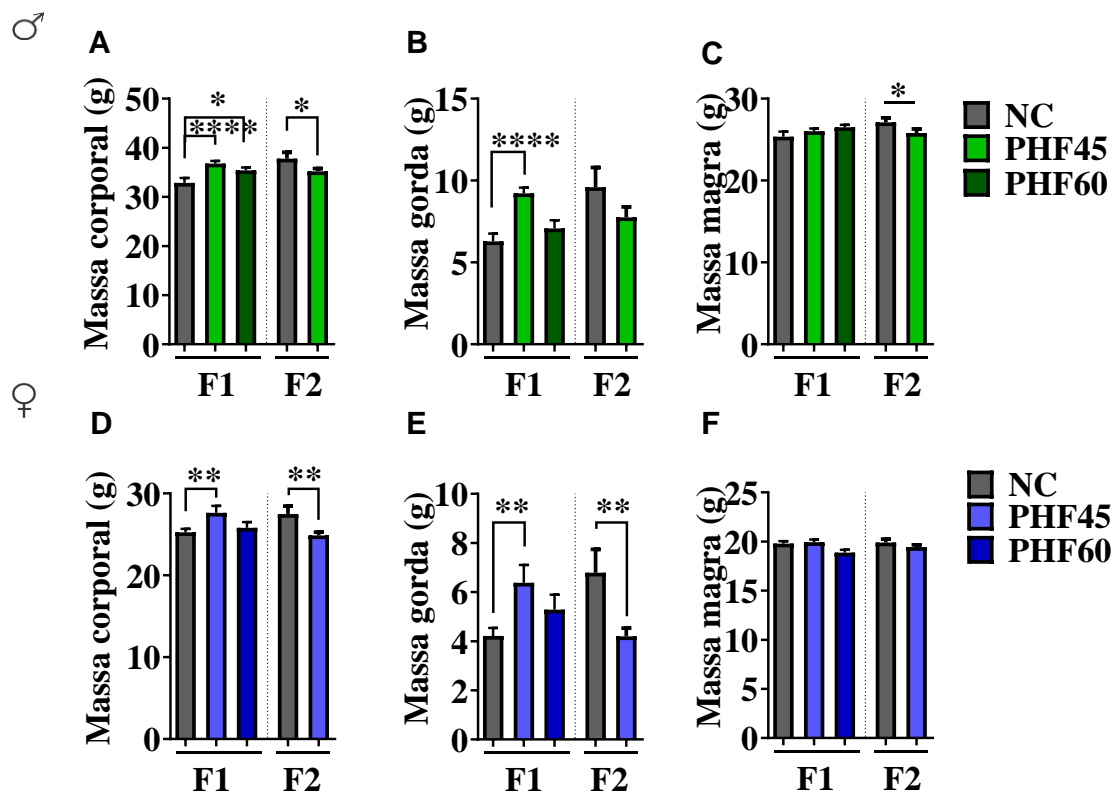
Para investigar se a obesidade paterna é capaz de alterar a composição corporal dos filhotes durante a vida, o RMN foi realizado nas 6ª, 10ª, 15ª e 25ª semanas de idade. Os resultados de massa corporal total, massa gorda e massa magra estão apresentados a seguir na figura 17, para valores observados da 6ª até 15ª semana de idade, e na figura 18 os resultados obtidos na 25ª semana de idade. Os valores numéricos encontram-se nas tabelas 3, 4 e 5 do Anexo B.

Ao observarmos os machos da geração F1, notamos que somente ao final do protocolo experimental, na 25ª semana de idade, os filhotes da prole F1-PHF45 e F1-PHF60 apresentaram aumento de massa corporal de 29% e 24%, respectivamente, quando comparados aos animais da prole NC (Figura 18A). Na F2 observamos redução na massa corporal de 7% nos machos F2-PHF45 na 25ª semana de idade (Figura 18A). Quanto ao teor de massa gorda, observou-se que somente os filhotes machos da prole F1-PHF45 apresentaram aumento de 47% na massa gorda, em ambas as idades de 15 e 25 semanas (Figuras 17H e 18B, respectivamente), sem qualquer alteração deste parâmetro na geração F2. Em relação à massa magra, nenhuma alteração foi observada na geração F1 (Figuras 17C, 16F, 16I e 18C). No entanto, machos da prole F2-PHF45 apresentaram leve redução (5%) de massa magra na 25ª semana de idade (Figura 18C).

Os filhotes fêmeas da F1 apresentaram aumento de massa corporal (10%) no grupo F1-PHF45, na 25ª semana de idade (Figura 18D). Tal fenótipo foi invertido na geração F2, onde fêmeas da prole F2-PHF45 apresentaram redução de 10% na massa corporal, na mesma idade (Figura 18D). Em relação a massa gorda, a prole F1-PHF45 apresentou aumento de 34% e 51%, nos tempos de 6 e 25 semanas de idade, respectivamente (Figuras 17K e 18E, respectivamente). Adicionalmente, a prole F1-PHF60 apresentou aumento de massa gorda (35%) apenas na 10ª semana de idade (Figura 17N). Em relação à F2, fêmeas da prole F2-PHF45 apresentaram redução de 38% de massa gorda, em relação a prole F2-NC, na 25ª semana de idade (Figura 18E). Nenhuma alteração de massa magra foi observada nos filhotes fêmeas em nenhum tempo estudado, em ambas as gerações F1 e F2 (Figuras 17J-R, 18D-F).



**Figura 17: Análise da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as idades de 6, 10 e 15 semanas.** Da esquerda para a direita, estão as representações gráficas dos valores de massa corporal (g), massa gorda (g) e massa magra (g) de filhotes machos (A-I, em verde) e fêmeas (J-R, em azul). De cima para baixo, vemos a evolução de tais parâmetros as 6, 10 e 15 semanas de idade. Nos filhotes machos, observamos maior conteúdo de massa gorda na prole F1-PHF45, na 15ª semana de idade (H) e sem alterações significativas na proporção de massa magra (C, F, I) ou da massa corporal total (A, D, G). Nos filhotes fêmeas, observamos maior conteúdo de massa gorda na prole F1-PHF45 na 6ª semana de idade (K) e na prole F1-PHF60 na 10ª semana de idade (N), de forma transitória, sem alterações significativas na proporção de massa magra (L, O, R) ou da massa corporal total (J, M, P). Nenhuma alteração significativa foi observada na geração F2 entre os grupos experimentais, independente do sexo. NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 9-28 animais/ grupo; *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p = 0,001$ ; NC vs PHF45 ou PHF60.



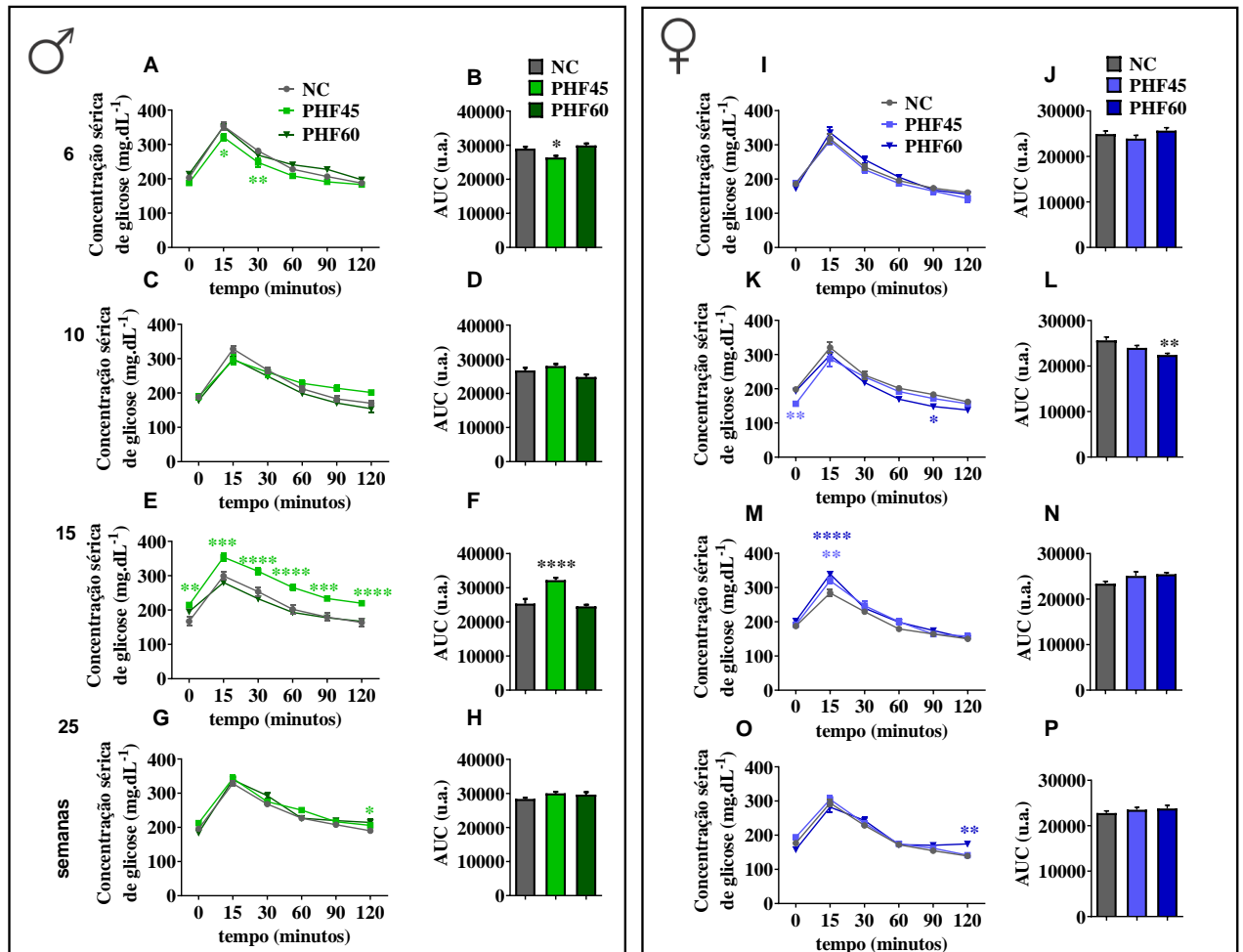
**Figura 18: Análise da composição corporal das proles F1 e F2 de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta na 25ª semana de idade.** Da esquerda para a direita, estão as representações gráficas dos valores de massa corporal (g), massa gorda (g) e massa magra (g) de filhotes machos (A-C, em verde) e fêmeas (D-F, em azul). Nos filhotes machos, observamos que a prole F1-PHF45 apresentou aumento de massa corporal (A) associado ao acúmulo de massa gorda (B), e a prole F2-PHF45 apresentou redução de massa corporal (A) associado à menor proporção de massa magra (C). Nos filhotes fêmeas, observamos que a prole F1-PHF45 apresentou aumento de massa corporal (D) e massa gorda (E). Inversamente, na F2, a prole fêmea F1-PHF45 apresentou menor massa corporal (D) e massa gorda (E), sem alterações em massa magra (F). NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 6-28 animais/ grupo; *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs PHF45 ou PHF60.

Para investigar se a obesidade paterna é capaz de alterar a tolerância a glicose dos filhotes durante a fase adulta, o TTG foi realizado nas 6ª, 10ª, 15ª e 25ª semanas de idade. Os resultados obtidos para a F1 (Figura 19) e F2 (Figura 20) estão descritos a seguir.

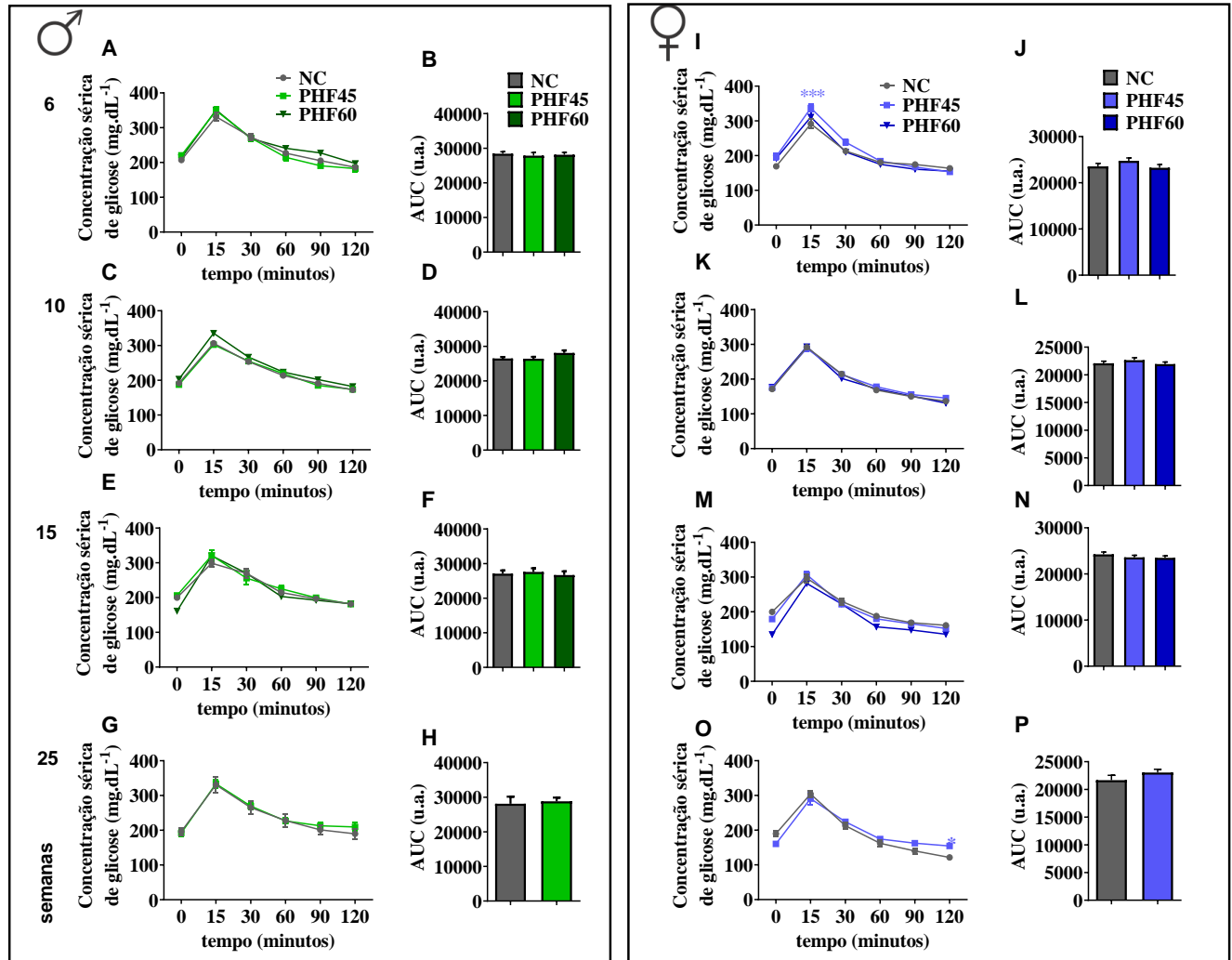
Observou-se que, na F1, os filhotes machos apresentaram alterações transitórias no metabolismo glicídico. Na 6ª semana de idade, a área abaixo da curva é menor na prole F1-PHF45 quando comparada ao grupo F1-NC (Figura 19A-B). Isto é perdido na 15ª semana de idade, como podemos ver nos valores de AUC aumentados (Figura 19E-F), sugerindo uma condição pré-diabética transitória na prole F1-PHF45, visto que tal alteração não foi mantida na 25ª semana de idade (Figura 19G-H). Nenhuma alteração foi observada nesse parâmetro nos machos da prole F1-PHF60, comparados aos F1-NC (Figuras 19A-H). Nos filhotes fêmeas, nenhuma alteração foi observada na prole F1-PHF45 (Figuras 19I-P). As fêmeas da

prole F1-PHF60 apresentaram melhora transitória no metabolismo glicídico, somente na 10ª semana de idade (Figura 19K-L).

Na prole F2, nenhuma alteração foi observada nesse parâmetro nos filhotes machos ou fêmeas em nenhum dos tempos estudados, de ambas as proles F2-PHF45 e F2-PHF60, comparados aos F2-NC, indicando que esse fenótipo não foi transmitido para a segunda geração (Figura 19).



**Figura 19:** Análise da evolução do metabolismo da glicose de filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) da primeira geração (F1) de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta durante as 6ª, 10ª, 15ª e 25ª semanas de idade. Da esquerda para a direita, estão listados a curva de concentração sérica de glicose ( $\text{mg.dL}^{-1}$ ) ao longo de 2 horas após a administração em *bolus* intraperitoneal de glicose e valores de área sob a curva (AUC, unidades arbitrárias). De cima para baixo, a evolução ao longo das idades de 6, 10, 15 e 25 semanas. Resumidamente, observamos melhor tolerância a glicose na prole macho F1-PHF45 na 6ª semana de idade (A-B), e piora desse parâmetro na 15ª semana de idade (E-F), ambos transitórios. Na prole fêmea, somente o grupo F1-PHF60 apresentou melhor tolerância a glicose, transitoriamente, na 10ª semana de idade (K-L). NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 9-27 animais/ grupo; One way ANOVA, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p = 0,001; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs PHF45 ou PHF60.



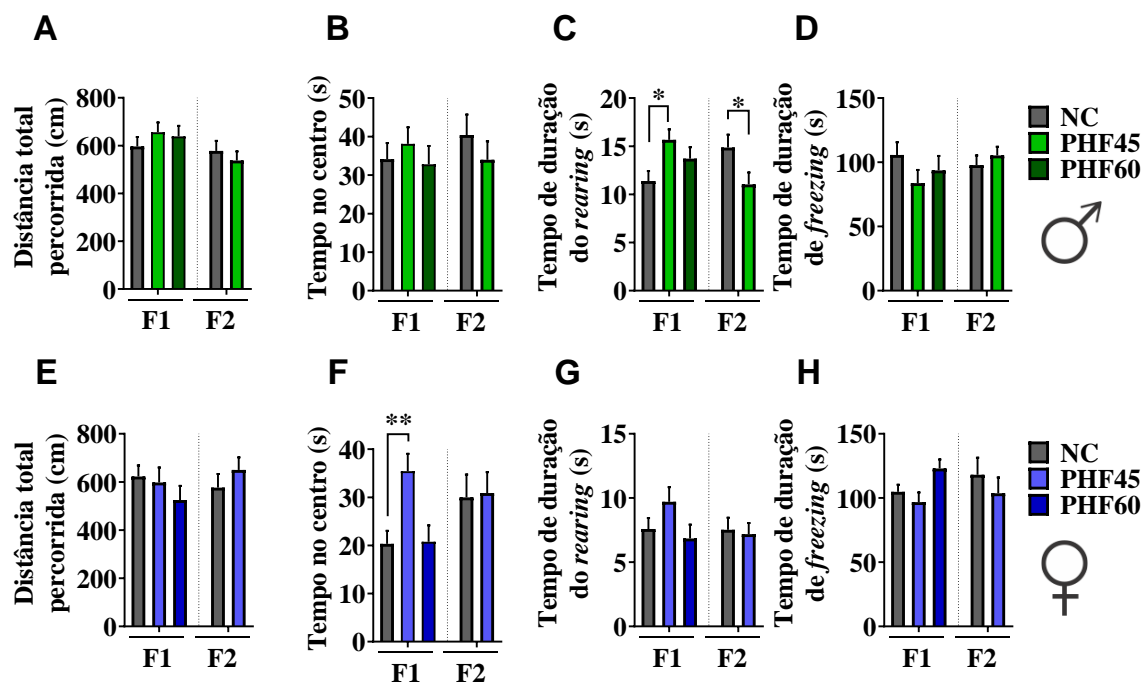
**Figura 20:** Análise da evolução do metabolismo da glicose filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) da segunda geração (F2) de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta durante as 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> semanas de idade. Da esquerda para a direita, estão listados a curva de concentração sérica de glicose (mg.dL<sup>-1</sup>) ao longo de 2 horas após a administração em *bolus* intraperitoneal de glicose e valores de área sob a curva (AUC, unidades arbitrárias). De cima para baixo, a evolução ao longo das idades de 6, 10, 15 e 25 semanas. Nenhuma alteração significativa neste fenótipo foi observada na prole macho (A-H) ou fêmea (I-P) da geração F2. NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 7-37 animais/ grupo; Teste *t de Student* ou *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; NC vs PHF45 ou PHF60.

#### 5.4.2. Análise comportamental

Para investigar se a obesidade paterna é capaz de alterar o comportamento espontâneo de filhotes machos e fêmeas de duas gerações consecutivas, o teste de campo aberto foi realizado na 15ª semana de idade dos animais.

Não observamos nenhuma alteração na distância total percorrida (em centímetros) (Figura 21A) e no tempo de permanência no centro (em segundos) (Figura 21B) entre os filhotes machos nas gerações F1 e F2. No entanto, ao avaliarmos o tempo de duração do *rearing* (em segundos), observamos aumento deste parâmetro em machos F1-PHF45 (35%) e redução na geração seguinte (26%), em machos F2-PHF45 (Figura 21C). Nenhuma alteração no tempo de *freezing* (em segundos) foi observada na prole macho de ambas as gerações (Figura 21D).

Em relação aos filhotes fêmeas, nenhuma alteração foi observada na distância total percorrida entre os grupos experimentais em ambas as gerações F1 e F2 (Figura 21E). Em contrapartida, fêmeas F1-PHF45 apresentaram aumento no tempo de permanência no centro (74%) (Figura 21F). Tal alteração não foi observada na geração F2 (Figura 21F). Quanto aos tempos de *rearing* e *freezing*, nenhuma alteração foi observada na prole fêmea de ambas as gerações F1 e F2 (Figura 21G e 21H, respectivamente). Os dados citados acima estão graficamente representados na Figura 21, e seus valores numéricos encontram-se nas tabelas 6 e 7 do Anexo B.



**Figura 21: Análise comportamental da prole macho (verde) e fêmea (azul) de camundongos machos submetidos ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta na 15ª semana de idade, através do teste de campo aberto, por duas gerações subsequentes.** As representações gráficas indicam: A, E- Distância total percorrida (cm), B, F- Tempo no centro do campo aberto (segundos), C, G- Tempo de duração do *rearing* (segundos) e, D, H- Tempo de duração do *freezing* (segundos), em machos e fêmeas, respectivamente. Observamos que os machos F1-PHF45 apresentaram maior tempo de *rearing*, e que o oposto foi observado na geração subsequente, F2-PHF45 (C). Nos filhotes fêmeas, a única alteração observada foi aumento do tempo de permanência no centro do campo aberto na prole F1-PHF45 (F). NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM; n= 10-13 animais/ grupo; Teste t ou *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; NC vs PHF45 ou PHF60.

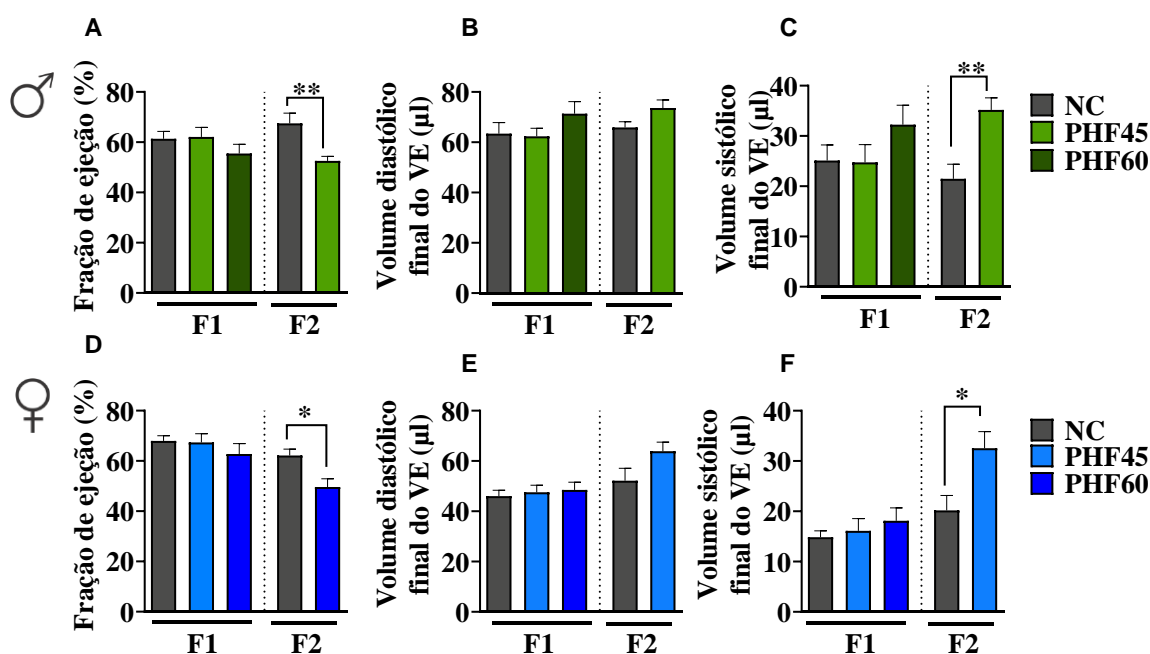
### 5.4.3. Análise da função cardíaca

Para investigar se a obesidade paterna é capaz de alterar a função cardíaca de filhotes machos e fêmeas de duas gerações consecutivas, o ecocardiograma foi realizado na 25ª semana de idade dos animais.

Não observamos quaisquer alterações significativas na função cardíaca de filhotes machos da geração F1 (Figura 22A-C). Na F2, observamos redução de 22% na fração de ejeção do VE (Figura 22A), associada ao aumento de 64% no volume sistólico final do VE nos machos F2-PHF45 (Figura 22C).



Em relação aos filhotes fêmeas, nenhuma alteração foi observada na geração F1 entre os grupos experimentais (Figura 22D-F). No entanto, observamos redução de 20% na fração de ejeção do VE (Figura 22D) associada ao aumento de 61% no volume sistólico final do VE nas fêmeas do grupo F2-PHF45 (Figura 22F). Tal observação demonstra que a obesidade paterna é capaz de modular a função cardíaca da F2, e não da F1, independente do sexo do filhote. Os dados citados acima estão graficamente representados na Figura 22, e seus valores numéricos encontram-se nas tabelas 8 e 9 do Anexo B.



**Figura 22: Análise da função cardíaca de filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) provenientes de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25ª semana de idade, das gerações F1 e F2. A, D- Fração de ejeção (%), B, E- Volume diastólico final do ventrículo esquerdo (VE) (µL), e C, F- Volume sistólico final do VE (µL) de filhotes machos e fêmeas, respectivamente. Nos machos, observamos que a geração F1 não apresentou nenhuma alteração nos parâmetros demonstrados (A-C). No entanto, na F2, filhotes machos apresentaram redução da fração de ejeção (A) associada ao aumento do volume sistólico final do VE (C). Em fêmeas, observamos que a geração F1 não apresentou nenhuma alteração nos parâmetros demonstrados (D-F). No entanto, na F2, filhotes fêmeas apresentaram redução da fração de ejeção (D) associada ao aumento do volume sistólico final do VE (F). NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 9-27 animais/ grupo; Teste t ou One way ANOVA, Tukey post hoc; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; NC vs PHF45 ou PHF60.**

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos (1) as consequências do consumo de dietas hiperlipídicas (45 ou 60% de lipídeos), por 6 semanas consecutivas, sobre a constituição corporal, tolerância à glicose e comportamento geral em camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6J e, (2) de que forma a obesidade materna e paterna influencia a constituição corporal, tolerância à glicose, comportamento e função cardíaca nas duas gerações subsequentes, tanto na prole macho quanto na fêmea.

Os resultados evidenciaram que, em camundongos fêmeas, o consumo de dieta hiperlipídica é capaz de promover aumento de massa corporal e adiposidade, associado a um prejuízo no metabolismo glicídico, independente do percentual de lipídeos na dieta e do sexo do animal. Não observamos mudanças comportamentais relativas a locomoção e distância percorrida, no entanto, o grupo HF60 apresentou aumento no tempo de *grooming* e redução na taxa de sobrevivência da prole ao final da lactação. Quanto aos efeitos da obesidade materna, em geral, os filhotes machos foram mais afetados. Filhotes da prole F1-MHF45 apresentaram aumento de adiposidade desde a 10<sup>a</sup> semana de idade, e prejuízo no metabolismo glicídico a partir da 15<sup>a</sup> semana. Na F2, somente machos F2-MHF45 apresentaram redução de massa corporal, redução da fração de ejeção do VE e aumento do volume sistólico final. A prole fêmea, por conseguinte, não apresentou grandes alterações em sua composição corporal, na avaliação comportamental identificamos somente aumento no tempo de permanência no centro do campo aberto, e não apresentou alterações na função cardíaca.

Em camundongos machos submetidos a dieta hiperlipídica, tanto as dietas de 45% quanto de 60% da energia proveniente de lipídeos levam ao aumento de peso corporal, adiposidade, aumento de massa magra e intolerância à glicose, sendo esta mais significativa no grupo HF60 do que no HF45, sem alterações comportamentais no teste de campo aberto. Quanto aos efeitos da obesidade paterna, as alterações observadas foram mais evidentes na prole PHF45, e semelhantes entre filhotes machos e fêmeas. De forma geral, filhotes F1-PHF45 apresentaram aumento de massa corporal, adiposidade e alterações no tempo de duração do *rearing* (machos F1-PHF45 apresentaram aumento, machos F2-PHF45 apresentaram redução desse parâmetro) e tempo de permanência no centro (fêmeas F1-PHF45); enquanto a geração subsequente apresentou redução de massa corporal independente do sexo, redução no tempo de duração do *rearing* (machos F2-PHF45), redução da fração de ejeção do VE e aumento do volume sistólico final, tanto em machos como fêmeas F2-PHF45.

A obesidade e sobrepeso tem gerado preocupação crescente no cenário mundial, por aumentar o risco de desenvolvimento de doenças crônicas não-comunicáveis, como diabetes do tipo 2, síndrome metabólica e dislipidemia, depressão e enxaquecas, doenças cardíacas e hipertensão arterial em indivíduos obesos ou com sobrepeso (GRUNDY, 1998; BELL *et al.*, 2005; SCHIMIDT & DUNCAN, 2011). Além disso, atualmente, tem sido amplamente discutida sua contribuição no incremento da taxa de ocupação de leitos em todo o mundo, visto que a obesidade leva ao maior risco de severidade dos sintomas da infecção pelo SARS-CoV-2, o COVID-19 (TANAKA *et al.*, 2001; ALWARAWRAH *et al.*, 2018; SIMONNET *et*

*al.*, 2020; TARTOF, *et al.*, 2020). Diversos fatores ambientais são atribuídos nas causas da obesidade na sociedade atual, sendo a globalização e a decorrente mudança alimentar uma das mais cruciais. Estudos com humanos têm demonstrado que o aumento no consumo de lipídeos é associado ao maior ganho de peso corporal, podendo levar a obesidade e suas consequências metabólicas (COSTA-FONT & MAS, 2016). Dessa forma, modelos animais são extremamente úteis no estudo da obesidade e dos mecanismos por trás do consumo energético em excesso (BUETTNER *et al.*, 2007).

Existem diversas formas de se reproduzir, em laboratório, a obesidade da sociedade ocidental, e uma das mais descritas é a obesidade induzida por dieta. As dietas mais comuns para essa finalidade geralmente são hipercalóricas e altamente palatáveis, para a indução rápida da obesidade e demais alterações metabólicas encontradas em indivíduos com sobrepeso, como a intolerância à glicose (DIEMEN *et al.*, 2006). Inúmeros trabalhos estão descritos na literatura, mas as informações extraídas são extremamente conflitantes (CHRISTIANS *et al.*, 2019), principalmente pela variedade de protocolos experimentais, modelos animais, linhagens, tipos de dietas e seus principais componentes nutricionais, dentre outros.

Neste trabalho, utilizamos duas dietas obesogênicas comerciais amplamente utilizadas em um mesmo protocolo experimental, para minimizar algumas variáveis e facilitar a comparação. As dietas hipercalóricas utilizadas neste trabalho são do tipo *high-fat*, ou seja, rica em lipídeos, contendo 45 e 60% da energia proveniente de gorduras saturadas, em sua maior parte. Do ponto de vista nutricional, uma dieta humana com 60% de gorduras é considerada extrema; porém esta escolha foi baseada em modelos experimentais já descritos na literatura onde houve rápida indução da obesidade (GHIBAUDI *et al.*, 2002; JOHNSTON *et al.*, 2007), permitindo o estudo no período de tempo disponível para a pesquisa.

Dessa forma, camundongos da linhagem C57BL/6J foram submetidos a dietas hiperlipídicas com porcentagens de 45 (HF45) e 60 (HF60) da energia proveniente de lipídeos da 4ª até a 10ª semana de idade. Sob essas condições, observamos que as fêmeas dos grupos HF45 e HF60 tiveram aumento significativo de peso corporal (8 e 20%, respectivamente) associado à maior adiposidade (57% e 1,5x, respectivamente) em comparação ao grupo controle. Tal alteração na composição corporal foi acompanhada de provável alteração no metabolismo glicídico, sugerido aqui pelo aumento da AUC durante o TTG, em cerca de 20% para ambos os grupos.

Tais achados corroboram com o descrito na literatura pois, a maioria dos roedores tende a se tornar obeso quando submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica (ROSSMEISL *et al.*, 2003; GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; LUMENG *et al.*, 2007; GABRIEL *et al.*, 2012; GELINEAU *et al.*, 2017). No entanto, o ganho de peso corporal, adiposidade e distúrbios metabólicos característicos da SMet são variáveis por conta da espécie e linhagem escolhida, bem como dos protocolos experimentais. Em camundongos, algumas linhagens do tipo *inbred* são mais suscetíveis à obesidade induzida por dieta, como é o caso da AKR e C57BL/6J (ROSSMEISL *et al.*, 2003), ou da DBA/2J (TORTORIELLO *et al.*, 2004) enquanto outras são extremamente resistentes, como camundongos das linhagens SWR/J e A/J (SURWIT *et al.*, 1995; PRPIC *et al.*, 2002).

Os dados encontrados neste trabalho corroboram com a pesquisa de outros grupos onde fêmeas C57BL/6J, quando submetidas a dieta hiperlipídica (HF45 ou HF60)

apresentaram aumento de peso corporal, adiposidade e intolerância à insulina (GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; GABRIEL *et al.*, 2012; KING *et al.*, 2013; LUZZO *et al.*, 2014; SASSON *et al.*, 2015; HUYPENS *et al.*, 2016; SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016; GELINEAU *et al.*, 2017). Alguns desses modelos também apresentaram distúrbios hormonais e dislipidemias, observados pela hiperleptinemia, hiperglicemia e hipercolesterolemia desenvolvidos (GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; KING *et al.*, 2013; LUZZO *et al.*, 2014; HUYPENS *et al.*, 2016; SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016). Tais resultados também foram descritos em outras linhagens, como a CD-1, onde fêmeas em dieta hiperlipídica HF60 desenvolveram aumento no ganho de peso, adiposidade, intolerância à glicose e resistência insulínica associados a alterações estruturais e inflamação no tecido adiposo branco, bem como disposição ectópica de lipídeos no fígado (GAO *et al.*, 2015).

Em alguns trabalhos, no entanto, nem todas as alterações foram observadas. O fornecimento de HF45 a camundongos fêmeas gerou aumento significativo de peso corporal, mas nenhuma alteração de massa gorda (TORTORIELLO *et al.*, 2004). MCPHERSON e colaboradores (2015), por sua vez, observaram aumento na adiposidade, porém nenhuma mudança significativa na glicemia ou insulinemia. Tais resultados divergentes são em parte explicados pelos diferentes teores de lipídeos na dieta, cerca de 21% (MCPHERSON *et al.*, 2015) ou 45% (TORTORIELLO *et al.*, 2004).

Outro fator importante para as alterações de peso corporal é a ingestão alimentar. Em roedores, é comum que haja hiperfagia durante a primeira semana de oferta de dietas hiperlipídicas, visto que geralmente são mais palatáveis (BAKE *et al.*, 2014). Durante o andamento do tratamento, essa redução da ingestão calórica costuma ser normalizada, ou até mesmo reduzida (ZECA, 2015), o que pode ser explicado pelo maior efeito de saciedade de dietas com maior teor lipídico (WOODS *et al.*, 2003) ou até mesmo por causa da digestão mais lenta deste nutriente em comparação com dietas ricas em carboidrato (UHLEY & JEN, 1989; BLE-CASTILLO *et al.*, 2012). Devido a limitações técnicas, não foi possível realizar a ingestão alimentar nos grupos estudados, mas acredita-se que a ingestão alimentar não foi mais relevante do que excesso de calorias na dieta, visto que, independente da manutenção ou redução da ingestão alimentar, as fêmeas apresentaram aumento de peso corporal, diretamente relacionado ao aumento de massa gorda no organismo.

Em relação ao comportamento no teste de campo aberto, as fêmeas em HFD não apresentaram alterações significativas na distância total percorrida nem no tempo de permanência no centro da plataforma, corroborando com dados descritos anteriormente para esta linhagem de camundongos (GELINEAU *et al.*, 2017), dando indícios que o consumo de HFD não altera a locomoção e atividade exploratória de fêmeas.

Interessantemente, observamos aumento de 60% no tempo de duração do *grooming* em fêmeas HF60. O comportamento de *grooming* em animais é um comportamento inato que envolve higiene e outros processos fisiologicamente importantes, incluindo termorregulação e comunicação social (SPRUIJT *et al.*, 1988; 1992). É um dos comportamentos mais frequentes observados em roedores despertos, e apresenta sequência organizada e padronizada de progressão cefalocaudal (BERRIDGE & ALDRIDGE, 2000; KALUEFF *et al.*, 2007). Tal comportamento pode ser modulado pela incidência de doenças neurodegenerativas, bem como distúrbios hormonais (KALUEFF *et al.*, 2016). Por conta da amplitude de fatores que podem levar a essa alteração, não é possível inferir nenhuma alteração relevante no

comportamento dos camundongos HF60, sem que outros testes comportamentais sejam associados.

Para avaliar se a obesidade materna estaria influenciando na capacidade reprodutiva deste modelo, avaliamos a taxa de nascimento, o número de filhotes por ninhada e a sobrevivência de filhotes ao final da lactação. Nenhum dos parâmetros avaliados foram alterados nas fêmeas HF45, enquanto fêmeas do grupo HF60 apresentaram exclusivamente redução na taxa de sobrevivência dos filhotes após a lactação. Independente da dieta fornecida, neste trabalho, o percentual relativo à taxa de nascimento foi menor do que 70%, relativamente baixo em relação a capacidade reprodutiva de camundongos em geral. Tal ruído pode ser parcialmente explicado pelo manejo do ciclo estral antes do acasalamento, visto que fêmeas com até dois dos três ciclos estrais analisados foram mantidas no experimento. Além disso, o laboratório no qual a pesquisa foi feita é localizado em região com grande variação sazonal, com todas as estações altamente marcadas, de forma que alguns parâmetros reprodutivos e hormonais sejam afetados sazonalmente (MURRAY *et al.*, 2010; DELAHUNTY *et al.*, 2009; MEYER *et al.*, 2006). Acredita-se que os animais percebam pequenas variações na umidade atmosférica, ainda que o laboratório de experimentação animal seja altamente controlado, como informação exposta no site oficial do The Jackson Laboratory.

Em relação aos efeitos da dieta hiperlipídica, os dados do presente trabalho corroboram com TORTORIELLO e colaboradores (2004), que observaram que camundongos dessa linhagem não apresentam problemas na fertilidade e desenvolvimento dos filhotes durante gestação e lactação em dieta HF45 (TORTORIELLO *et al.*, 2004). Por outro lado, SKAZNIK-WIKIEL e colaboradores (2016) observaram efeitos negativos do consumo de HF60 sobre a taxa de gravidez e o número de filhotes por ninhada, possivelmente relacionado com o quadro inflamatório sistêmico, aumento de marcadores inflamatórios no estroma ovariano e redução na qualidade dos oócitos (SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016).

Com a finalidade de investigar o papel da obesidade materna sobre a composição corporal e metabolismo de glicose nas proles F1 e F2, os exames de RMN e TTG foram realizados na prole macho e fêmea, nas 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> semanas de idade. Na geração F1, observamos que os filhotes machos da prole F1-MHF45 já apresentavam aumento de massa gorda desde a 10<sup>a</sup> semana de idade, no entanto, aumento no peso corporal só foi visualizado na 25<sup>a</sup> semana de idade. Nas fêmeas, alterações na quantidade de massa gorda foi observada somente na 6<sup>a</sup> semana de idade no grupo F1-MHF45. No grupo F1-MHF60, as fêmeas apresentaram aumento de adiposidade ao final do protocolo experimental, na 25<sup>a</sup> semana de idade, sem que nenhuma alteração corporal fosse observada ao longo de todo o experimento, em nenhum dos grupos estudados. Em relação ao metabolismo da glicose, a obesidade materna foi capaz de modular a tolerância a glicose somente na prole macho. Na prole F1-MHF45, houve prejuízo na eliminação da glicose sanguínea desde a 15<sup>a</sup> semana até a 25<sup>a</sup> semana de idade. Em contrapartida, machos da prole F1-MHF60 apresentaram melhora transitória do metabolismo glicídico na 10<sup>a</sup> semana de idade.

O desenvolvimento de obesidade, sobrepeso e distúrbios metabólicos em consequência da obesidade materna é amplamente descrito e revisado na literatura, tanto em humanos quanto em modelos experimentais (SAMUELSSON *et al.*, 2008; VIDO *et al.*, 2014; GODFREY *et al.*, 2017; MENTING *et al.*, 2018; NICHOLAS & OZANNE, 2019; HSU *et al.*, 2020). Neste trabalho, a obesidade materna foi adquirida a partir do consumo de dieta

hiperlipídica por seis semanas, em camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, da 4ª à 10ª semana de idade. Antes da concepção, matrizes que receberam HF45 ou HF60 encontravam-se obesas e com prejuízo no metabolismo glicídico em proporções semelhantes. Ainda assim, as consequências foram distintas entre as proles MHF45 e MHF60, evidenciando assim a importância do percentual de lipídeos na dieta materna para as consequências metabólicas na prole. Outros fatores a serem levados em consideração são a espécie adotada, linhagem e tempo de fornecimento de dieta hiperlipídica às matrizes antes da gestação (NICHOLAS & OZANNE, 2019).

De forma esperada, os resultados observados aqui corroboram com dados existentes na literatura que utilizaram protocolos experimentais semelhantes. Por exemplo, a prole de ratas (NIVOIT *et al.*, 2009) ou camundongos (BLACKMORE *et al.*, 2014) obesos por consumo de dieta hiperlipídica com altos teores de lipídeos (superiores a 45%) e açúcares também apresentaram aumento na massa gorda que não foi acompanhado por diferenças no peso corporal (NIVOIT *et al.*, 2009; BLACKMORE *et al.*, 2014). De forma contrária, trabalhos que utilizaram dietas com percentual menor de lipídeos na dieta (cerca de 29%) e maior tempo de exposição materna demonstraram alterações de peso corporal desde momentos pós-desmame que persistiram durante toda a vida do animal (SRINIVASAN *et al.*, 2006; FRANCO *et al.*, 2012; DE ALMEIDA *et al.*, 2020).

YOKOMIZO e colaboradores (2014) estudaram a prole de camundongos expostos a HF60 por 1 semana antes da gestação. Como resultado, machos e fêmeas apresentaram aumento de adiposidade e hiperinsulinemia na 6ª semana de idade. De forma semelhante ao descrito aqui, a prole macho foi mais afetada do que as fêmeas, que demonstraram a maior propensão à SMet após serem diretamente exposta à HF60 (YOKOMIZO *et al.*, 2014). Mecanismos que explicam o dimorfismo sexual na programação fetal continuam sendo um desafio na área. Uma possibilidade seria a participação de hormônios sexuais, visto que o estrogênio apresenta efeitos anti-diabéticos em fêmeas (LOUET *et al.*, 2004), bem como a administração deste em machos é capaz de reverter alguns aspectos da SMet (FINAN *et al.*, 2012). Adicionalmente, trabalhos indicam que machos apresentam taxa de crescimento fetal superior à das fêmeas, o que pode torná-los mais vulneráveis a adversidades no microambiente intrauterino (AIKEN & OZANNE, 2013).

Na geração F2, somente filhotes machos apresentaram alterações significativas em relação à composição corporal. A prole F2-MHF45 apresentou leve aumento de massa gorda na 6ª semana de idade, e ao final do experimento, na 25ª semana de idade, observamos redução do peso corporal. Na prole F2-MHF60 o observado foi uma redução no peso corporal, associado à menor quantidade de massa magra, na 6ª semana de idade. Tal efeito não foi mantido ao final do experimento, onde as proles não exibiam qualquer diferença significativa na composição corporal, em relação aos controles. Quanto ao metabolismo glicídico da F2, nenhuma alteração foi observada. DUNN e BALE (2009) estudaram os efeitos do consumo da dieta HF45 em camundongos fêmeas híbridas C57BL/6:129 por 4 semanas antes da concepção e durante toda a gestação e lactação nas proles macho e fêmea por duas gerações seguidas. Embora a geração F1 tenha apresentado aumento de peso e resistência insulínica, tais efeitos não foram transmitidos para a geração F2, que apresentou peso corporal semelhante aos controles e melhores respostas no metabolismo glicídico (DUNN & BALE, 2009). Tal trabalho corrobora, em parte, com os resultados encontrados no presente estudo, além de indicar que alguns fenótipos podem ser invertidos entre as gerações F1 e F2.

Sabe-se que as alterações de peso corporal podem ser influenciadas também por fatores relacionados à ingestão alimentar da prole. ORNELLAS e colaboradores (2015) observaram que parte do ganho de peso da prole advindas de machos e/ou fêmeas obesas é consequência da maior ingestão alimentar nesses grupos (ORNELLAS *et al.*, 2015). No presente trabalho, no entanto, a ingestão alimentar das proles F1 e F2 não foi realizada por questões técnicas relacionadas à textura das dietas fornecidas. Dentre as análises propostas posteriormente está a realização do experimento de gaiola metabólica, para mensurações de alterações metabólicas na atividade e gasto energético, utilizando equipamentos individualizados acoplados ao sistema de avaliação *Promethion* (*Sable Systems International, USA*).

Evidências epidemiológicas e experimentais sugerem que a exposição à obesidade materna ou consumo materno de HFD relacionam-se com desequilíbrios na estrutura neural e no desenvolvimento de distúrbios psicológicos e comportamentais, nos quais incluem prejuízo cognitivo, autismo, déficit de atenção e hiperatividade, esquizofrenia, compulsões alimentares, ansiedade e depressão (EDLOW, 2017; CONTU & HAWKES, 2017). Dessa forma, com a finalidade de avaliar se a obesidade materna é capaz de alterar o comportamento da prole na fase adulta, realizamos o teste de campo aberto nas proles macho e fêmea, das gerações F1 e F2, na 12ª semana de idade. No presente modelo, nenhuma alteração comportamental foi observada na prole macho. Quanto aos filhotes fêmeas, observamos que o grupo F1-MHF45 apresentou aumento de 86% no tempo de permanência no centro do CA, sem que esse fenótipo fosse também observado na F2. O teste de campo aberto é geralmente utilizado para testar comportamentos análogos à ansiedade, bem como o grau de locomoção e exploração do animal, sendo interessante no *screening* inicial de modelos. Em condições normais, roedores tipicamente evitam o centro do campo aberto, visto que o centro é uma área clara e aberta em um ambiente novo, que confere mais estresse ao animal (ARCHER, 1973; WILSON *et al.*, 1976). Neste modelo, somente fêmeas F1-MHF45 apresentaram alteração comportamental no teste de campo aberto, de forma que este grupo estaria apto para avaliações mais detalhadas de comportamento, como a associação de outros testes comportamentais, como o labirinto em cruz elevada, uma vez que não é possível inferir informações claras sobre o comportamento de um grupo com apenas um teste comportamental. Ainda, observou-se que as fêmeas analisadas encontravam-se em fases variadas do ciclo estral no momento do teste. Sabendo-se da importância do ciclo estral e suas alterações hormonais no comportamento de fêmeas, análises futuras estão sendo planejadas para análises das fêmeas em cada uma das fases do ciclo estral, para determinar a relevância desse fator no modelo experimental deste trabalho.

Modelos animais de roedores tem sido uma importante ferramenta no entendimento da obesidade materna aumentar comportamentos análogos à ansiedade na prole, mas há divergência entre os sexos afetados. Dentre alguns testes utilizados para essa finalidade podemos citar o labirinto em cruz elevado e o teste de campo aberto, preferencialmente associados a alterações em neurotransmissores e/ou morfologia dos núcleos cerebrais correspondentes. BILBO e TSANG (2010) descreveram que a prole macho de fêmeas em HFD apresentaram maior comportamento análogo a ansiedade do que as fêmeas nesse teste ao nadar mais rápido no labirinto de Morris, indicando maior motivação para escapar. De forma similar, machos também apresentaram menor tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevada (BILBO & TSANG, 2010), de forma contrária aos dados obtidos no presente trabalho.

Os dados obtidos aqui divergem do observado na literatura. SASAKI e colaboradores (2013) observaram que machos apresentaram menor tempo no centro do campo aberto, enquanto KANG e colaboradores (2014) observaram essa alteração em filhotes fêmeas (SAKAKI *et al.*, 2013; KANG *et al.*, 2014). Tais divergências podem ser parcialmente atribuídas aos diferentes protocolos experimentais utilizados.

Ao observar a função cardíaca da prole, não observamos qualquer alteração na fração de ejeção ou no volume diastólico e sistólico finais do VE em nenhum dos sexos, na geração F1. Interessantemente, na geração F2, os machos cujas matrizes receberam HF45, apresentaram redução da fração de ejeção do VE, cerca de 25%, associado ao aumento de 64% no volume sistólico final, sugerindo disfunção sistólica. Tais resultados vão contra o estudo de BLACKMORE e colaboradores (2014), que demonstraram que a obesidade materna promoveu hipertrofia cardíaca e de cardiomiócitos, expressão *de novo* de genes fetais, o que indica remodelamento patológico do órgão de filhotes machos da prole F1 (BLACKMORE *et al.*, 2014). Adicionalmente, esses animais apresentaram disfunção sistólica e diastólica cardíaca, aumento da sensibilidade adrenérgica em modelo de coração isolado e aumento da pressão arterial sistólica (BLACKMORE *et al.*, 2014; LOCHE *et al.*, 2018).

Quanto aos efeitos da obesidade materna na função cardíaca a partir da F2, poucos trabalhos foram encontrados. FERREY e colaboradores (2019) recentemente evidenciaram que o consumo materno de dieta rica em lipídeos e açúcares é capaz de induzir disfunção cardíaca mitocondrial de forma transgeracional, tanto em filhotes machos quanto fêmeas das gerações F2 e F3 (FERREY *et al.*, 2019). Dessa forma, ainda que alterações fisiológicas não tenham sido observadas nos filhotes fêmeas no nosso modelo, estudos moleculares mais aprofundados são necessários para o entendimento dos mecanismos por trás da programação fetal de alterações cardíacas.

Tendo em vista que a obesidade paterna tem sido descrita como fator que predispõe ao desenvolvimento de doenças crônicas e SMet nas gerações seguintes (NG *et al.*, 2010; RANDO, 2012; ORNELLAS *et al.*, 2015; 2017), o presente trabalho também teve como objetivo estudar os efeitos da obesidade paterna sobre aspectos metabólicos, comportamentais e cardíacos em duas gerações consecutivas. Para tal, camundongos da linhagem C57BL/6J foram submetidos a dietas hiperlipídicas com porcentagens de 45 (HF45) e 60 (HF60) de lipídeos da 4ª até a 10ª semana de idade. Sob essas condições, observamos que os machos dos grupos HF45 e HF60 tiveram aumento significativo de peso corporal (cerca de 40%) associado à maior adiposidade (aumento de 2,0x) em comparação ao grupo controle, acompanhada de provável alteração no metabolismo glicídico, sugerida aqui pelo aumento da AUC durante o TTG em cerca de 25% no grupo HF45 e 50%, no grupo HF60.

Como mencionado anteriormente, o fornecimento de dieta hiperlipídica, especialmente com quantidade de lipídeos superior a 40%, leva ao aumento de peso corporal em grande parte dos modelos experimentais (ROSSMEISL *et al.*, 2003; GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; GELINEAU *et al.*, 2017). De forma semelhante, o aumento de massa gorda é frequente em machos, que inclusive tendem a desenvolver maiores índices de adiposidade do que as fêmeas (GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; CHAMBERS *et al.*, 2016; GELINEAU *et al.*, 2017). Alterações metabólicas, como resistência à insulina e intolerância à glicose também estão presentes (GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; GABRIEL *et al.*, 2012; KING *et al.*, 2013; LUZZO *et al.*, 2014; SASSON *et al.*, 2015; HUYPENS *et al.*, 2016; SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016; GELINEAU *et al.*, 2017), bem como distúrbios hormonais e dislipidemias



(GALLOU-KABANI *et al.*, 2007; KING *et al.*, 2013; LUZZO *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2015; HUYPENS *et al.*, 2016; SKAZNIK-WIKIEL *et al.*, 2016).

Em relação ao comportamento no teste de campo aberto, os machos em HFD não apresentaram alterações significativas na distância total percorrida ou no tempo de permanência no centro da plataforma, discordando parcialmente com GELINEAU e colaboradores (2017), que mostraram redução nos valores da distância percorrida em machos HFD. Tal discrepância pode ser explicada pela diferença de idade entre os animais durante a execução do CA (GELINEAU *et al.*, 2017). Nenhuma alteração no tempo de *grooming* foi observada em consequência do consumo de HFD, o que sugere que o consumo de HFD por seis semanas não é capaz de alterar de forma significativa aspectos comportamentais neste modelo.

Quanto aos efeitos da obesidade paterna sobre a composição corporal e metabolismo de glicose na prole, observamos que machos e fêmeas da F1-PHF45 apresentaram aumento de massa corporal e adiposidade somente na 25ª semana de idade, sem grandes alterações no TTG. Tais informações divergem do modelo de obesidade paterna desenvolvido por CHAMBERS e colaboradores (2016), no qual ratos da linhagem Sprague-Dawley foram alimentados com HF45, e somente os filhotes fêmeas F1 apresentaram maior ganho de peso na 19ª semana de idade (CHAMBERS *et al.*, 2016).

Dados descritos por outros grupos de pesquisa corroboram com os encontrados, onde não foram observadas alterações significativas de peso corporal ou no metabolismo glicídico até a 16ª semana de idade de filhotes machos da prole F1 de camundongos obesos (HUYPENS *et al.*, 2016; MASUYAMA *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2018). No entanto, na 24ª semana de idade, a obesidade foi observada (MASUYAMA *et al.*, 2016). Adicionalmente, uma interessante meta-análise, com dados epidemiológicos e experimentais, publicada recentemente evidenciou uma associação entre a obesidade e/ou sobrepeso paterno com remodelamento do tecido adiposo, aumento da expressão de genes relacionados a obesidade, intolerância à glicose e resistência insulínica (SHARP & LAWLOR, 2019).

Na geração F2, filhotes machos e fêmeas apresentaram redução no peso corporal ao final do experimento, enquanto nenhuma alteração foi observada quanto à tolerância a glicose. Tal dado diverge de CHAMBERS e colaboradores (2016). Neste, filhotes machos apresentaram aumento de adiposidade e leptina sérica, sem alterações significativas nos filhotes fêmeas F2 (CHAMBERS *et al.*, 2016). Tal discrepância entre os resultados pode ser explicado por diferenças na espécie escolhida e no protocolo experimental adotados.

Para avaliar se a obesidade paterna é capaz de alterar respostas comportamentais na prole, inicialmente foi feito o teste de campo aberto para triagem inicial. Os resultados demonstraram que a prole macho F1-PHF45 teve maior tempo de duração de *rearing*, enquanto a prole F2-PHF45 apresentou redução neste parâmetro. Em relação aos filhotes fêmeas, foi observado aumento de 74% no tempo de permanência do centro, somente na geração F1.

O *rearing* é caracterizado movimento onde o animal encontra-se em posição vertical, somente com as patas traseiras no solo. É considerado um comportamento tipicamente exploratório e tem sido utilizado como uma medida indireta de ansiedade tanto no campo aberto quanto no labirinto em cruz elevado (ENNACEUR, 2014; SEIBENHENER & WOOTEN, 2015), sendo o aumento no tempo de *rearing* associado a quadros de ansiedade

em camundongos (BORTA & SCHWARTING, 2005). No contexto da obesidade paterna, os resultados encontrados no campo aberto estão de acordo com o descrito por ZHOU e colaboradores (2018), que não observaram alterações na distância total ou tempo de centro em filhotes machos da prole F1. Quanto à F2, este é o primeiro trabalho que demonstrou interesse nesta geração, sem outros dados na literatura para comparação até o presente momento. Desta forma, parece interessante continuar as avaliações comportamentais não somente na primeira, mas também nas gerações subsequentes, com investigações mais detalhadas e outros testes comportamentais para esclarecer se a obesidade paterna poderia afetar o comportamento de sua prole.

Ao analisar os efeitos da obesidade paterna sobre a função cardíaca da prole, não observamos qualquer alteração na fração de ejeção ou no volume diastólico e sistólico finais do VE em nenhum dos sexos, na geração F1. Na geração F2, entretanto, machos e fêmeas da prole F2-PHF45 apresentaram redução da fração de ejeção do VE, cerca de 20%, associado ao aumento de aproximadamente 60% no volume sistólico final, sugerindo disfunção sistólica. É a primeira vez que esta análise é feita em um modelo de obesidade paterna em mamíferos, sendo anteriormente realizado somente em *Drosophila*. Neste, GUIDA e colaboradores (2019) avaliaram a função cardíaca em duas gerações subsequentes de moscas submetidas a dieta hiperlipídica.

O coração da *Drosophila* é um órgão simples e tubular, composto basicamente por cardiomiócitos (as células de trabalho, comparáveis às células contráteis em mamíferos), células do óstio (presentes na região equivalente ao sistema vascular de mamíferos, por onde a hemolinfa chega ao coração) e as células pericárdicas, que constituem uma rede neural símile, além de funcionar como um sensor para estresse oxidativo no miocárdio (VOGLER & BODMER, 2015). Os resultados de GUIDA e colaboradores indicaram que a obesidade parental, tanto na geração F1 quanto na F2, levou ao maior risco de desenvolvimento de alterações na função cardíaca, incluindo redução dos diâmetros das cavidades após sístole e diástole, redução da fração de encurtamento no óstio, aumento de células não contráteis no miocárdio, dentre outras, que só desapareceram na terceira geração em dieta exclusivamente normolipídica (GUIDA *et al.*, 2019). Tais alterações foram correlacionadas à elevação sistêmica da H3K27me3, uma alteração epigenética caracterizada pela trimetilação (me3) do resíduo de lisina (K) 27 na proteína histona (H) 3 (GUIDA *et al.*, 2019).

Atualmente, diversos trabalhos utilizam-se de plataformas de genotipagem de alto desempenho com a finalidade de desvendar mecanismos de doenças de causas múltiplas (TAK & FARNHAM, 2015). São os chamados GWAS (do inglês, *genome-wide association studies*), onde a utilização de dados obtidos em um microarranjo de DNA, contendo milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) é capaz de identificar SNPs associados a diversas doenças complexas (WELTER *et al.*, 2014). Fatores epigenéticos também precisam ser levados em conta ao estudar a interação entre genótipo e fenótipo e, neste contexto, marcações de histonas, como acetilações e metilações de resíduos de lisina na H3 promovem papel importante na regulação da transcrição gênica (HARIKUMAR & MESHORER, 2015).

PAPAIT e colaboradores (2013) observaram que regiões com aumento da marcação H3K27me3 foram relacionadas com redução na transcrição gênica e alterações na organização e regulação da estrutura sarcomérica de cardiomiócitos, em modelo experimental de hipertrofia cardíaca, em camundongos (PAPAIT *et al.*, 2013). Além disso, regiões do DNA com distribuição diferenciada da H3K27me3 foram associados a hipertrofia cardíaca,

alteração da espessura da parede ventricular, contração cardíaca defeituosa, e alterações no débito sistólico (PAPAIT *et al.*, 2013).

Sendo assim, sugerimos que alterações epigenéticas estejam envolvidas na transmissão inter- e transgeracional da disfunção cardíaca em nosso modelo de obesidade materna e paterna, respectivamente. Estudos moleculares mais aprofundados são necessários para que sejam desvendados mecanismos envolvidos na programação metabólica deste modelo.

## 7. CONCLUSÕES

Em relação aos animais submetidos ao consumo de dieta hiperlipídica, observamos que, independente do percentual de lipídeos na dieta, tanto machos quanto fêmeas desenvolvem aumento de massa corporal e adiposidade, associado a um prejuízo no metabolismo glicídico após 6 semanas de dieta, neste modelo experimental. Adicionalmente, o aumento de 20% no teor lipídico na alimentação de fêmeas ocasionou baixa taxa de sobrevivência de filhotes após a lactação.

Em relação aos efeitos da obesidade materna na prole, os filhotes machos foram, em geral, mais afetados. Filhotes da prole F1-MHF45 apresentaram aumento de adiposidade desde a 10ª semana de idade, e prejuízo no metabolismo glicídico a partir da 15ª semana. Na F2, somente machos F2-MHF45 apresentaram redução de massa corporal, indicando que há transmissão paradoxal deste parâmetro. Ainda que fossem mais leves, no entanto, os filhotes machos F2-MHF45 apresentaram moderada disfunção cardíaca. A prole fêmea, por conseguinte, apresentou alterações de menor gravidade e, muitas vezes, transitórias, sem qualquer alteração na função cardíaca. Tais dados indicam que há dimorfismo sexual nas consequências da obesidade materna, neste modelo experimental.

Na obesidade paterna, as consequências observadas foram semelhantes entre filhotes machos e fêmeas. Independente do sexo, os filhotes F1-PHF45 apresentaram aumento de massa corporal e adiposidade; enquanto a geração subsequente (F2) apresentou redução de massa corporal e disfunção cardíaca mais evidente. Esta é a primeira vez que é observada disfunção cardíaca de forma transgeracional em um modelo experimental de obesidade paterna em mamíferos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHIMA, R. S.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, v. 11, p. 327-32, 2000.
- AHLUWALIA, N.; ANDREEVA V. A.; KESSE-GUYOT, E.; HERCBERG, S. Dietary patterns, inflammation and the metabolic syndrome. **Diabetes & Metabolism**, 2012
- AIKEN, C. E.; OZANNE, S. E. Sex differences in developmental programming models. **Reproduction**, v. 145, p. 1-13, 2013.
- ALBERTI, K. G. M. M.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z.; CLEEMAN, J. I.; DONATO, *et al.* Harmonizing the Metabolic Syndrome: A Joint Interim Statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, v. 120, p. 1640-5, 2009.
- ALWARAWRAH, Y.; KIERNAN, K.; MACIVER, N. J. Changes in nutritional status impact immune cell metabolism and function. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1055, 2018.
- AMAR, J.; CHABO, C.; WAGET, A.; KLOPP, P.; VACHOUX, C.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; SMIRNOVA, N.; BERGÉ, M.; SULPICE, T.; LAHTINEN, S.; OUWEHAND, A.; LANGELLA, P.; RAUTONEN, N.; SANSONETTI, P. J.; BURCELIN, R. Intestinal mucosal adherence and translocation of commensal bacteria at the early onset of type 2 diabetes: molecular mechanisms and probiotic treatment. **EMBO Mol Med**, v. 3, n. 9, p. 559-572, 2011.
- AN, H. M.; PARK, S.Y.; LEE, D.K.; KIM, J.R.; CHA, M.K.; LEE, S.W.; *et al.* Antiobesity and lipid-lowering effects of Bifidobacterium spp. in high fat diet-induced obese rats. **Lipids Health Dis**, v.10, p. 116, 2011.
- ANDERSON, L. M.; RIFFLE, L.; WILSON, R.; TRAVLOS, G. S.; LUBOMIRSKI, M. S.; ALVORD, W. G. Preconceptional fasting of fathers alters serum glucose in offspring of mice. **Nutrition**, v. 22, p. 327–331, 2006.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Anim. Behav.**, v. 21, p. 205–235, 1973.
- ARMITAGE, J. A.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Developmental origins of obesity and the metabolic syndrome: The role of maternal obesity. **Front Horm Res**, v. 36, p. 73–84, 2008.
- ARMSTRONG, L. Epigenetics, 1ª edição. Garland Science, New York, 2014.

- AUBERT, J.; DARIMONT, C.; SAFONOVA, I.; AILHAUD, G.; NEGREL, R. Regulation by glucocorticoids of AGT gene expression and secretion in adipose cells. **Biochem J.**, v. 328, p. 701-706, 1997.
- AUBERT, J.; SAFONOVA, I.; NEGREL, R.; AILHAUD, G. Insulin down-regulates angiotensinogen gene expression and angiotensinogen secretion in cultured adipose cells. **Biochem Biophys. Res Commun.**, v. 250, p. 77-82, 1998.
- BALE, T. L. Sex differences in prenatal epigenetic programming of stress pathways. **Stress**, v. 14, p. 348-356, 2011.
- BALSEVICH, G.; BAUMANN, V.; URIBE, A.; CHEN, A.; SCHMIDT, M. V. Prenatal exposure to maternal obesity alters anxiety and stress coping behaviors in aged mice. **Neuroendocrinology**, v. 103, p. 354-68, 2016.
- BARATTA, R.; AMATO, S.; DEGANO, C.; FARINA, M.G.; PATANE, G.; VIGNERI, R.; FRITTITTA, L. Adiponectin relationship with lipid metabolism is independent of body fat mass: Evidence from both cross-sectional and intervention studies. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 2665–2671, 2004.
- BARBOSA, C.; FIGUEIREDO, V.; BARBOSA, M.; CARDOSO, L.; ALZAMORA, A. Maternal high-fat diet triggers metabolic syndrome disorders that are transferred to first and second offspring generations. **British Journal of Nutrition**, v. 123, n. 1, p. 59-71, 2020.
- BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ**, v. 301, p. 1111, 1990.
- BARKER, D. J. The fetal origins of diseases of old age. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v. 46, s. 3, p. S3-S9, 1992.
- BARKER, D. J. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, v. 261, n. 5, p. 412-17, 2007.
- BELL, C. G.; WALLEY, A. J.; FROGUEL, P. The genetics of human obesity. **Nat. Rev. Genet.**, v. 6, p. 221–23, 2005.
- BELTOWSKI, J.; WÓJCICKA, G.; MARCINIAK, A.; JAMROZ, A. Oxidative stress, nitric oxide production, and renal sodium handling in leptin-induced hypertension. **Life Sci**, v. 74, n. 24, p. 2987-3000, 2004.
- BERENSON, G. S.; SRINIVASAN, S. R.; Cardiovascular risk in young persons: secondary or primordial prevention? **Ann Intern Med.**, v. 153, n. 3, p. 202-203, 2010.
- BERNAL, R. T. I.; MALTA, D. C.; ISER, B. P. M.; MONTEIRO, R. A.. Método de projeção de indicadores das metas do Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das Doenças Crônicas não Transmissíveis no Brasil segundo capitais dos estados e Distrito Federal. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 25, n. 3, 2016.
- BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W. Super-stereotypy II: enhancement of a complex movement sequence by intraventricular dopamine D1 agonists. **Synapse**, v. 37, p. 205–215, 2000.

BILBO, S. D.; TSANG, V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. **FASEB J.**, v. 24, p. 2104–2115, 2010.

BINDER, N. K.; BEARD, S. A.; KAITU'U-LINO, T. J.; TONG, S.; HANNAN, N. J.; GARDNER, D. K. Paternal obesity in a rodent model affects placental gene expression in a sex-specific manner. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 149, n. 5, p. 435–444, 2015.

BLACKMORE, H. L.; NIU, Y.; FERNANDEZ-TWINN, D. S.; TARRY-ADKINS, J. L.; GIUSSANI, D. A.; OZANNE, S. E. Maternal diet-induced obesity programs cardiovascular dysfunction in adult male mouse offspring independent of current body weight. **Endocrinology**, v. 155, n. 10, p. 3970–3980, 2014.

BLAKEMORE, A. I.; FROGUEL, P. Investigation of Mendelian forms of obesity holds out the prospect of personalized medicine. **Ann. N.Y.Acade. Sci.**, v. 1214, p. 180–189, 2010.

BLE-CASTILLO, J. L.; APARICIO-TRAPALA, M. A.; JUÁREZ-ROJOP; I. E.; TORRES-LOPEZ, J. E.; MENDEZ, J. D.; AGUILAR-MARISCAL, H.;OLVERAHERNÁNDEZ, V.; PALMA-CORDOVA, L. C.; DIAZ-ZAGOYA, J. C. Differential Effects of High-Carbohydrate and High-Fat Diet Composition on Metabolic Control and Insulin Resistance in Normal Rats. **Int J Environ Res Public Health**, v. 9, p. 1663-1676, 2012.

BONEY, C. M.; VERMA. A.; TUCKER, R.; VOHR. B. R. Metabolic syndrome in childhood: Association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. **Pediatrics**, v.115, p. 290–296, 2005.

BOOTH, A.; MAGNUSON, A.; FOUTS, J.; FOSTER, M. Adipose tissue, obesity and adipokines: Role in cancer promotion. **Hormone Mol. Biol. Clin. Invest**, v. 21, p. 57-74, 2015.

BORTA, A.; SCHWARTING, R. K. Inhibitory avoidance, pain reactivity, and plus-maze behavior in Wistar rats with high versus low rearing activity. **J. Phys. Behav.**, v. 84, p. 387-396, 2005.

BOUCHARD, C.; TREMBLAY, A.; DESPRES, J. P.; NADEAU, A.; LUPIEN, P. J.; THERIAULT, G.; DUSSAULT, J.; MOORJANI, S.; PINAULT, S.; FOURNIER, G. The response to long-term overfeeding in identical twins. **N. Engl. J. Med.**, v. 322, p. 1477–1482, 1990.

BOULOUMIÉ, A.; DREXLER, H. C. A.; LAFONTAN, M.; BUSSE, R. Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. **Circ. Res**, v. 83, p. 1059–1066, 1998.

BRAVO, P. E.; MORSE, S.; BORNE, D. M.; AGUILAR, E. A.; REISIN, E. Leptin and hypertension in obesity. **Vascular Health and Risk Management**, v. 2, n. 2, p. 163–169, 2006.

BRINGHENTI, I.; MORAES-TEIXEIRA, J. A.; CUNHA, M. R.; ORNELLAS, F.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Maternal obesity during the preconception and early life periods alters pancreatic development in early and adult life in male mouse offspring. **PLoS One**, v. 8, n. 1, p. e55711, 2013.

BROMFIELD, J. J. Seminal fluid and reproduction: much more than previously thought. **J Assist Reprod Genet.**, v. 31, n. 6, p. 627–636, 2014.

- BUCKMAN, L. B.; HASTY, A. L.; FLAHERTY, D. K.; BUCKMAN, C. T.; THOMPSON, M. M.; MATLOCK, B. K.; *et al.* Obesity induced by a high-fat diet is associated with increased immune cell entry into the central nervous system. **Brain Behav Immun**, v. 35 p. 33-42, 2014.
- BUETTNER, R.; SCHOLMERICH, J.; BOLLHEIMER, L.C. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, p. 798-808, 2007.
- BURDGE, G. C.; SLATER-JEFFERIES, J.; TORRENS, C.; PHILLIPS, E. S.; HANSON, M. A.; LILLYCROP, K. A. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. **Br J Nutr.**, v. 97, p. 435–439, 2007.
- BYGREN, L. O.; KAATI, G.; EDVINSSON, S. Longevity determined by paternal ancestors' nutrition during their slow growth period. **Acta Biotheor.**, v. 49, p. 53-59, 2001.
- CANNON B, NEDERGAARD J. Brown adipose tissue: function and physiological significance. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 1, p. 277-359, 2004.
- CAPELL, W. H.; ZAMBON, A.; AUSTIN, M. A.; BRUNZELL, J. D.; HOKANSON, J. E. Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL subclass phenotype A and LDL subclass phenotype B. **Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.**, v. 16 p. 1040-1046, 1996.
- CAPURSO, C.; CAPURSO, A. From excess adiposity to insulin resistance: The role of free fatty acids. **Vascul. Pharmacol**, v. 57, p. 91-97, 2012.
- CARONE, B. R.; FAUQUIER, L.; HABIB, N.; SHEA, J. M.; HART, C. E.; LI, R.; BOCK, C.; LI, C.; GU, H.; ZAMORE, P. D.; MEISSNER, A.; WENG, Z.; HOFMANN, H. A.; FRIEDMAN, N.; RANDO, O. J. Paternally induced transgenerational environmental reprogramming of metabolic gene expression in mammals. **Cell**, n. 143, p. 1084–1096, 2010.
- CASSIS, L. A. Fat cell metabolism: insulin, fatty acids, and renin. **Curr Hypertens Rep**, v. 2, p. 132–138, 2000.
- CHAIT, A.; DEN HARTIGH, L. J. Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. **Front. Cardiovasc. Med**, 2020.
- CHALK, M. B.; Obesity: addressing a multifactorial disease. **Case Manager**, v. 15, n. 6, p. 47-50, 2004.
- CHAMBERS, T.; MORGAN, M. D.; HEGER, A. H.; SHARPE, R. M.; DRAKE, A. J. High-fat diet disrupts metabolism in two generations of rats in a parent-of-origin specific manner. **Scientific reports**, v. 6, p. 31857, 2016.
- CHAMPAGNE, F.; MEANEY, M. J. Like mother, like daughter: Evidence for non-genomic transmission of parental behavior and stress responsivity. **Prog. Brain Res.**, v. 133, p. 287–302, 2001.



CHAVARRO, J. E.; FURTADO, J.; TOTH, T. L.; FORD, J.; KELLER, M.; CAMPOS, H.; HAUSER, R. Trans-fatty acid levels in sperm are associated with sperm concentration among men from an infertility clinic. **Fertil Steril**, n. 95, p. 1794–1797, 2011.

CHEN, Y-P.; XIAO, X-M.; LI, J.; REICHETZEDER, C.; WANG, Z-N.; HOCHER, B. Paternal body mass index (BMI) is associated with offspring intrauterine growth in a gender dependent manner. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e36329, 2012.

CHOQUET, H.; MEYRE, D. Molecular basis of obesity: current status and future prospects. **Curr Genomics.**, v. 12, n. 3, p. 154-168, 2011.

CHOWDHURY, S. S.; LECOMTE, V.; ERLICH, J. H.; MALONEY, C. A.; MORRIS, M. J. Paternal high fat diet in rats leads to renal accumulation of lipid and tubular changes in adult offspring. **Nutrients**, v. 8, p. 521, 2016.

CHRISTIANS, J. K.; LENNIE, K. I.; WILD, L. K.; GARCHA, R. Effects of high-fat diets on fetal growth in rodents: a systematic review. **RB&E**, v. 17, n. 1, p. 39, 2019.

COELHO, M.; OLIVEIRA, T.; FERNANDES, R. Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. **Arch Med Sci**, v. 9, n. 2, p. 191-200, 2013.

CONTU, L.; HAWKES, C. A. A Review of the impact of maternal obesity on the cognitive function and mental health of the offspring. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 18, p. 1093, 2017.

COSTA, J. V.; DUARTE, J. S.; Adipose tissue and adipokines. **Acta Med Port**, v. 19, n. 3, p. 251-6, 2006.

COSTA-FONT, J.; MAS, N. ‘Globesity’? The effects of globalization on obesity and caloric intake. **Food Policy**, v. 64, p. 121-132, 2016.

CREAN, A. J.; BONDURIANSKY, R. What is a paternal effect? **Trends Ecol Evol.**, v. 29, n. 10, p. 554–559, 2014.

CRISTANCHO, A. G.; LAZAR, M. A. Forming functional fat: A growing understanding of adipocyte differentiation. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 12, p. 722–734, 2011.

CURAT, C. A.; WEGNER, V.; SENGENÈS, C.; MIRANVILLE, A.; TONUS, C.; BUSSE, R.; *et al.* Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. **Diabetologia**, v. 49, p. 744–747, 2006.

DE ALMEIDA, M. M.; DIAS-ROCHA, C. P.; REIS-GOMES, C. F.; WANG, H.; CORDEIRO, A.; PAZOS-MOURA, C. C.; JOSS-MOORE, L.; TREVENZOLI, I. H. Maternal high-fat diet up-regulates type-1 cannabinoid receptor with estrogen signaling changes in a sex- and depot- specific manner in white adipose tissue of adult rat offspring. **Eur. J. Nutr.**, 2020.

DEACON, R. M. J. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. **Nature protocols**, v. 1.2, p. 936-946, 2006.

DELAHUNTY, K. M.; HORTON, L. G.; COOMBS, H. F. 3<sup>RD</sup>.; SHULTZ, K. L.; SVENSON, K. L.; MARION, M. A.; HOLICK, M. F.; BEAMER, W. G.; ROSEN, C. J. Gender- and compartment-specific bone loss in C57BL/6J mice: correlation to season? **J Clin Densitom.**, v. 12, n. 1, p. 89-94, 2009.

- DEMARCO, V. G.; AROOR, A. R.; SOWERS, J. R. The pathophysiology of hypertension in patients with obesity. **Nat Rev Endocrinol**, v. 10, p. 364-76, 2014.
- DIAMOND, F. The endocrine function of adipose tissue. **Growth Genetics Horm** v. 18, p. 17-23, 2002.
- DOLINOY, D. C.; JIRTLE, R. L. Environmental epigenomics in human health and disease. **Environ Mol Mutagen**, v. 49, p. 4-8, 2008.
- DRAKE, A. J.; REYNOLDS, R. M. Impact of maternal obesity on offspring obesity and cardiometabolic disease risk. **Reproduction**, v. 140, p. 387–398, 2010.
- DULLOO, A. G.; JACQUET, J; SOLINAS G; MONTANI; J. P.; SCHUTZ, Y. Body composition phenotypes in pathways to obesity and the metabolic syndrome. **Int J Obes (Lond)**, v. 34, s. 2, p. 4– 17, 2010.
- DUNN, G. A.; BALE, T. L. Maternal high-fat diet effects on third-generation female body size via the paternal lineage. **Endocrinology**, v. 152, n. 6, p. 2228-2236, 2011.
- DUNN, G. A.; BALE, T. L. Maternal high-fat diet promotes body length increases and insulin insensitivity in second-generation mice. **Endocrinology**, v. 150, p. 4999–5009, 2009.
- EATON, A. S.; AIKEN, A. J.; YOUNG, P. E.; HO, J. W. K.; CROPLEY, J. E.; SUTER, C. M. Maternal obesity heritably perturbs offspring metabolism for three generations without serial programming. **International Journal of Obesity**, v. 42, p. 911–914, 2018.
- EDLOW, A. G. Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. **Prenat. Diagn.**, v. 37, p. 95–110, 2017.
- EGUCHI, K.; NAGIA, R.; Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. **J Clin Invest**, v. 127, n. 1, p. 14-23, 2017.
- ELAHI, M. M, CAGAMPANG, F. R.; MUKHTAR, D.; ANTHONY, F. W.; OHRI, S. K.; HANSON, M. A. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. **Br J Nutr.**, v. 102, n. 4, p. 514-519, 2009.
- ELIAS, M. F.; ELIAS, P. K.; SULLIVAN, L. M.; WOLF, P. A.; D’AGOSTINO, R. B. Obesity, diabetes and cognitive deficit: The Framingham Heart Study. **Neurobiol Aging**, v. 26, p. 11-16, 2005.
- ENGELI, S.; GORZELNIAK, K.; KREUTZ, R.; RUNKEL, N.; DISTLER, A.; SHARMA, A. M. Co-expression of renin-angiotensin system genes in human adipose tissue. **J Hypertens**, v. 17, p. 555-560, 1999.
- ENNACEUR, A. Tests of unconditional anxiety – pitfalls and disappointments. **J. Phys. Behav.**, v. 135, p. 55-71, 2014.
- ESLER, M.; STRAZNICKY, N., EIKELIS, N., MASUO, K., LAMBERT, G., LAMBERT, E. Mechanisms of sympathetic activation in obesity-related hypertension. **Hypertension**, v. 48, p. 787–796, 2006.

FAN, L.; LINDSLEY, S.; COMSTOCK, S.; TAKAHASHI, D. L.; EVANS, A. E.; HE, G-W.; THORNBURG, K. L.; GROVE, K. L. Maternal high-fat diet impacts endothelial function in nonhuman primate offspring. **Int. J. Obes.**, v. 37, p. 254–262, 2013.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 115, n. 5, p. 911 – 919, 2005.

FEIL, R.; FRAGA, M. F. Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications. **Nat Rev Genet**, v. 13, p. 97–109, 2012.

FEREY, J. L.; BOUDOURES, A. L.; REID, M.; DRURY, A.; SCHEAFFER, S.; MODI, Z.; KOVACS, A.; PIETKA, T.; DEBOSCH, B. J.; THOMPSON, M. D.; DIWAN, A.; MOLEY, K. H. A maternal high-fat, high-sucrose diet induces transgenerational cardiac mitochondrial dysfunction independently of maternal mitochondrial inheritance. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 316, p. H1202–H1210, 2019.

FERNANDEZ-TWINN, D. S.; BLACKMORE, H. L.; SIGGENS, L.; GIUSSANI, D. A.; CROSS, C. M.; FOO, R.; OZANNE, S. E. The programming of cardiac hypertrophy in the offspring by maternal obesity is associated with hyperinsulinemia, AKT, ERK, and mTOR activation. **Endocrinology**, v. 153, n. 12, p. 5961–5971, 2012.

FERREIRA, A. P. S.; SZWARCOWALD, C. L.; DAMACENA, G. N. Prevalência e fatores associados da obesidade na população brasileira: estudo com dados aferidos da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Rev Bras Epidemiol**, v. 22, p. e190024, 2019.

FINAN, B.; YANG, B.; OTTAWAY, N.; STEMMER, K.; MÜLLER, T. D.; YI, C-X.; HABEGGER, K.; SCHRIEVER, S. C.; GARCÍA-CÁCERES, C.; KABRA, D. G.; HEMBREE, J.; HOLLAND, J.; RAVER, C.; SEELEY, R. J.; HANS, W.; IRMLER, M.; BECKERS, J.; DE ANGELIS, M. H.; TIANO, J. P.; MAUVAIS-JARVIS, F.; PEREZ-TILVE, D.; PFLUGER, P.; ZHANG, L.; GELFANOV, V.; DIMARCHI, R. D.; TSCHÖP, M. H. Targeted estrogen delivery reverses the metabolic syndrome. **Nat. Med.**, v. 18, p. 1847–1856, 2012.

FORTUÑO, A.; BIDEGAIN, J.; BALTANÁS, A.; MORENO, M. U.; MONTERO, L.; LANDECHO, M. F.; BELOQUI, O.; DÍEZ, J.; ZALBA, G. Is leptin involved in phagocytic NADPH oxidase overactivity in obesity? Potential clinical implications. **J Hypertens**, v. 28, p.1944–1950, 2010.

FRANCO, J. G.; FERNANDES, T. P.; ROCHA, C. P.; CALVIÑO, C.; PAZOS-MOURA, C. C.; LISBOA, P. C.; MOURA, E. G.; TREVENZOLI, I. H. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. **The Journal of Physiology**, v. 590, n. 21, p. 5503–5518, 2012.

FRANSSSEN, R.; MONAJEMI, H.; STROES, E. S.; KASTELEIN, J. J. Obesity and dyslipidemia. **Med. Clin. North. Am.**, v. 95, p. 893–902, 2011.

FRIEDMAN, J. M. Leptin at 14 y of age: an ongoing story. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n. 3, p. 973S-979S, Mar-2009.

FULLSTON, T.; PALMER, N. O.; OWENS, J. A.; MITCHELL, M.; BAKOS, H. W.; LANE, M. Diet-induced paternal obesity in the absence of diabetes diminishes the reproductive health of two subsequent generations of mice. **Hum. Reprod.**, v. 27, p. 1391–1400, 2012.

FULLSTON, T.; SHEHADEH, H. S.; SCHJENKEN, J. E.; MCPHERSON, N. O.; ROBERTSON, S. A.; ZANDER-FOX, D.; LANE, M. Paternal obesity and programming of offspring health. In: GREEN, L. R. & HESTER, R. L. Parental obesity: intergenerational programming and consequences, 1ª edição. The American Physiological Society, New York, 2016.

FULLSTON, T.; TEAGUE, E. M. C. O.; PALMER, N. O.; DEBLASIO, M. J.; MITCHELL, M.; CORBETT, M.; PRINT, C. G.; OWENS, J. A.; LANE, M. Paternal obesity initiates metabolic disturbances in two generations of mice with incomplete penetrance to the F2 generation and alters the transcriptional profile of testis and sperm microRNA content. **The FASEB Journal**, v. 27, p. 4226-4243, 2013.

GABORY, A.; ATTIG, L.; JUNIEN, C. Sexual dimorphism in environmental epigenetic programming. **Mol Cell Endocrinol**, v. 304, p. 8-18, 2009.

GABRIEL, C. L.; SMITH, P. B.; MENDEZ-FERNANDEZ, Y. V.; WILHELM, A. J.; YE, A. M.; MAJOR, A. S. Autoimmune-mediated glucose intolerance in a mouse model of systemic lupus erythematosus. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 303, p. E1313–E1324, 2012.

GAINSFORD, T.; WILLSON, T. A.; METCALF, D.; HANDMAN, E.; MCFARLANE, C.; NG, A.; NICOLA, N. A.; ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. Leptin can induce proliferation, differentiation, and functional activation of hematopoietic cells. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 93, p. 14564-8, 1996.

GALIC, S.; OAKHILL, J. S.; STEINBERG, G. R. Adipose tissue as an endocrine organ. **Mol Cell Endocrinol**, v. 316, p. 129-39, 2010.

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

GAO, M.; MA, Y.; LIU, D. High-fat diet-induced adiposity, adipose inflammation, hepatic steatosis and hyperinsulinemia in outbred CD-1 mice. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119784, 2015.

GELINEAU, R. R.; ARRUDA, N. L.; HICKS, J. A.; MONTEIRO DE PINA, I.; HATZIDIS, A.; SEGGIO, J. A. The behavioral and physiological effects of high-fat diet and alcohol consumption: Sex differences in C57BL6/J mice. **Brain Behav.**, v. 7, p. e00708, 2017.

GHIBAUDI, L.; COOK, J.; FARLEY, C.; VAN HECK, M.; HWA, J. J. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors, and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. **Obes Res**, v. 10, p. 956-963, 2002.

GHOSH, P.; BITSANIS, D.; GHEBREMESKEL, K.; CRAWFORD, M. A.; POSTON, L. Abnormal aortic fatty acid composition and small artery function in offspring of rats fed a high fat diet in pregnancy. **J Physiol**, v. 533, n. 3, p. 815–22, 2001.

GIRIKO, C. A.; ANDREOLI, C. A.; MENNITTI, L. V.; HOSOUME, L. F.; SOUTO-TDOS, S.; SILVA, A. V.; MENDES-DA-SILVA, C. Delayed physical and neurobehavioral development and increased aggressive and depression-like behaviors in the rat offspring of dams fed a high-fat diet. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 31, p. 731–739, 2013.

- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; COOPER, C.; *et al.* Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. **N Engl J Med**, v. 359, n. 1, p. 61-73, 2008.
- GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; SPENCER, H; G.; Predictive adaptive responses and human evolution. **Trends Ecol Evol**, v. 20, n. 10, p; 527-33, 2005.
- GNIULI, D.; CALCAGNO, A.; CARISTO, M. E.; MANCUSO, A.; MACCHI, V.; MINGRONE, G.; VETTOR, R. Effects of high-fat diet exposure during fetal life on type 2 diabetes development in the progeny. **J Lipid Res.**, v. 49, p. 1936–1945, 2008.
- GODFREY, K. M.; REYNOLDS, R. M.; PRESCOTT, S. L.; NYIRENDA, M.; JADDOE, V. W. M.; ERIKSSON, J. G.; BROEKMAN, B. F. P. Influence of maternal obesity on the long-term health of offspring. **The Lancet Diabetes & Endocrinology**, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2017.
- GOMES, D. C. K.; SICHIERI, R.; JUNIOR, E. V.; *et al.* Trends in obesity prevalence among Brazilian adults from 2002 to 2013 by educational level. **BMC Public Health**, v. 19, p. 965 2019.
- GONZALEZ-RIVAS, J. P.; NIETO-MARTÍNEZ, R.; BRAJKOVICH, I.; UGEL, E.; RÍSQUEZ, A. Prevalência de Dislipidemias em Três Regiões na Venezuela: Resultados do Estudo VEMSOLS. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 110, n. 1, 2018.
- GREEN, B. B.; MARSIT C. J. Select prenatal environmental exposures and subsequent alterations of gene-specific and repetitive element DNA methylation in fetal tissues. **Curr. Environ. Health Rep.**, v. 2, n. 2, p. 126–136, 2015.
- GRUNDY ,S. M.; CLEEMAN, J. I.; STEPHEN, R. D.; DONATO, K. A.; ECKEL, R. H.; FRANKLIN, B. A.; GORDON, D. J.; KRAUSS, R. M.; SAVAGE P. J.; *et al.* Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. **Circulation**, v. 112, p. 2735-2752, 2005.
- GRUNDY, S. M. Obesity, Metabolic Syndrome, and Coronary Atherosclerosis. **Circulation**, v. 105, p. 2696-2698, 2002.
- GUBERMAN, C.; JELLYMAN, J. K.; HAN, G.; ROSS, M. G.; DESAI, M. Maternal high-fat diet programs rat offspring hypertension and activates the adipose renin-angiotensin system. **Am J Obstet Gynecol**, v. 209, n. 3, p. 261–268, 2013.
- GUIDA, M. C.; BIRSE, R. T.; DALL’AGNESE, A.; TOTO, P. C.; DIOP, S. D.; MAI, A.; ADAMS, P. D.; PURI, P. L.; BODMER, R. Intergenerational inheritance of high fat diet-induced cardiac lipotoxicity in *Drosophila*. **Nat. Commun.**, v. 10, p. 193, 2019.
- GUO, F.; JEN, K. L. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. **Physiol. Behav.**, v. 57, p. 681–686, 1995.
- GUZIK, T. J.; MANGALAT, D.; KORBUT, R. Adipocytokines – novel link between inflammation and vascular function? **J Physiol Pharmacol**, v. 57, p. 505-28, 2006.
- HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **Diabetologia**, v. 35, p. 595–601, 1992.

- HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **Br Med Bull**, v. 60, n. 1, p. 5-20, 2001.
- HAMMOUD, A. O.; GIBSON, M.; STANFORD, J.; WHITE, G.; CARRELL, D. T.; PETERSON, M. In vitro fertilization availability and utilization in the United States: a study of demographic, social, and economic factors. **Fertil Steril**, v. 91, p. 1630–1635, 2009.
- HARIKUMAR, A.; MESHORER, E. Chromatin remodeling and bivalent histone modifications in embryonic stem cells. **EMBO Rep.**, v. 16, p. 1609-1619, 2015.
- HEARD, E.; MARTIENSSEN, R. A. Transgenerational epigenetic inheritance: myths and mechanisms. **Cell**, v. 157, p. 95-109, 2014.
- HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V.; ANDUS, T. Interleukin-6 and the acute phase response. **Biochemical Journal**, v. 265, n. 3, p. 621–636, 1990.
- HRUBY, A.; HU, F. B. The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. **Pharmaco Economics**, v. 33, n. 7, p. 673–689, 2015.
- HSU, M. H.; CHEN, Y. C.; SHEEN, J. M.; HUANG, L. T. Maternal obesity programs offspring development and resveratrol potentially reprograms the effects of maternal obesity. **Int. J. Envir. Res. and Pub. Health**, v. 17, n. 5, p. 1610, 2020.
- HU, E.; LIANG, P.; SPIEGELMAN, B. M. AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 10697–10703, 1996.
- HUANG, P. L. A comprehensive definition for metabolic syndrome. **Dis Model Mech**, v. 2, n. 5-6, p. 231-237, 2009.
- HUYPENS, P.; SASS, S.; WU, M.; DYCKHOFF, D.; TSCHÖP, M.; THEIS, F.; MARSCHALL, S.; HRABĚ DE ANGELIS, M.; BECKERS, J. Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. **Nat. Genet.**, v. 48, p. 497 – 499, 2016.
- HUYPENS, P.; SASS, S.; WU, M.; DYCKHOFF, D.; TSCHÖP, M.; THEIS, F.; MARSCHALL, S.; HRABĚ DE ANGELIS, M.; BECKERS, J. Epigenetic germline inheritance of diet-induced obesity and insulin resistance. **Nature genetics**, v. 48, n. 5, p. 497–499, 2016.
- INTERNATIONAL OBESITY TASKFORCE. The Global Epidemic. IASO/IOTB, 2019. Disponível em: <http://www.iaso.org/iotf/obesity/obesitytheglobalepidemic/> [Acessado em Jan 2019]
- IWAI, M.; CHEN, R.; IMURA, Y.; HORIUCHI, M. TAK-536, a new AT1 receptor blocker, improves glucose intolerance and adipocyte differentiation. **Am J Hypertens**, v. 20, p. 579-586, 2007.
- JAIS, A, BRÜNING, J. C. Hypothalamic inflammation in obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 127, n. 1, p. 24-32, 2017.
- JOHNSTON, S. L.; SOUTER, D. M.; TOLKAMP, B. J.; GORDON, I. J.; ILLIUS, A. W.; KYRIAZAKIS, I.; SPEAKMAN, J. R. Intake compensates for resting metabolic rate variation

in female C57BL/6J mice fed high-fat diets. **Obesity (Silver Spring)**, v. 15, p. 600-606, 2007.

JONES, B. H.; STANDRIDGE, M. K.; TAYLOR, J. W.; MOUSTAID, N. Angiotensinogen gene expression in adipose tissue: analysis of obese models and hormonal and nutritional control. **Am J Physiol**, v. 273, p. R236–R242, 1997.

JUAN, C. C.; CHUANG, T. Y.; LIEN, C. C.; LIN, Y. J.; HUANG, S. W.; KWOK, C. F.; HO, L. T. Leptin increases endothelin type A receptor levels in vascular smooth muscle cells. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 294, n. 3, p. E481-7, 2008.

JUNG, M.; PFEIFER, G. P. Aging and DNA methylation. **BMC Biol.**, v. 13, p. 7, 2015.

JUONALA, M.; PITKÄNEN, N.; TOLONEN, S.; LAAKSONEN, M.; SIEVÄNEN, H.; JOKINEN, E.; LAITINEN, T.; SABIN, M. A.; HUTRI-KÄHÖNEN, N.; LEHTIMÄKI, T.; TAITTONEN, L.; JULA, A.; LOO, B-M.; IMPIVAARA, O.; KÄHÖNEN, M.; MAGNUSSEN, C. N.; VIIKARI, J. S. A.; RAITAKARI, O. T. Childhood exposure to passive smoking and bone health in adulthood. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 6, p. 2403–2411, 2019.

KAATI, G.; BYGREN, L. O.; EDVINSSON, S. Cardiovascular and diabetes mortality determined by nutrition during parents' and grandparents' slow growth period. **Eur. J. Hum. Genet.**, v. 10, p. 682-8, 2002.

KAATI, G.; BYGREN, L. O.; PEMBREY, M.; SJOSTROM, M. Transgenerational response to nutrition, early life circumstances and longevity. **Eur J Hum Genet.**, v. 15, p. 784-90, 2007.

KADOWAKI, T.; YAMAUCHI, T. Adiponectin and adiponectin receptors. **Endocrine Reviews**, v. 26, n. 3, p. 439–451, 2005.

KALUEFF, A. V.; ALDRIDGE, J. W.; LAPORTE, J. L.; MURPHY, D. L.; TUOHIMAA, P. Analyzing grooming microstructure in neurobehavioral experiments. **Nat. Protoc.**, v. 2, p. 2538–2544, 2007.

KALUEFF, A. V.; STEWART, A. M.; SONG, C.; BERRIDGE, K. C.; GRAYBIEL, A. M.; FENTRESS, J. C. Neurobiology of rodent self-grooming and its value for translational neuroscience. **Nat. Rev. Neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 45–59, 2016.

KANG, S. S.; KURTI, A.; FAIR, D. A.; FRYER, J. D. Dietary intervention rescues maternal obesity induced behavior deficits and neuroinflammation in offspring. **J. Neuroinflammation**, v. 11, p. 156, 2014.

KANGARLU, A.; ROBITAILLE, P. M. L. Biological effects and health implications in magnetic resonance imaging. **Concepts Magn Reson**, v. 12, p. 321-359, 2000.

KHAN, I. Y.; TAYLOR, P. D.; DEKOU, V.; SEED, P. T.; LAKASING, L.; GRAHAM, D.; DOMINICZAK, A. F.; HANSON, M. A.; POSTON, L. Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. **Hypertension**, v. 41, p. 168–175, 2003.

KING, V.; DAKIN, R. S.; LIU, L.; HADOKI, P. W.; WALKER, B. R.; SECKL, J. R.; NORMAN, J. E.; DRAKE, A. J. Maternal obesity has little effect on the immediate offspring but impacts on the next generation. **Endocrinology**, v. 154, p. 2514– 2524, 2013.

- KLOP, B.; PROCTOR, S. D.; MAMO, J. C.; BOTHAM, K.M.; CASTRO-CABEZAS, M. Understanding postprandial inflammation and its relationship to lifestyle behaviour and metabolic diseases. **Int. J. Vasc. Med**, v. 2012, 947417, 2012.
- KOH, K. K.; HAN, S. H.; QUON M. J. Inflammatory markers and the metabolic syndrome: insights from therapeutic interventions. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 46, n. 11, p. 1978–1985, 2005.
- KONSTANTINIDES, S.; SCHAFER, K.; LOSKUTOFF, D. J. The Prothrombotic Effects of Leptin: Possible Implications for the Risk of Cardiovascular Disease in Obesity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 947, n. 1, 2006.
- KONUKOGLU, D.; SERIN, O.; TURHAN, M. S. Plasma leptin and its relationship with lipid peroxidation and nitric oxide in obese female patients with or without hypertension. **Arch Med Res**, v. 37, n. 5, p. 602-6, 2006.
- KORT, H. I.; MASSEY, J. B.; ELSNER, C. W.; MITCHELL-LEEF, D.; SHAPIRO, D. B.; WITT, M. A.; ROUDEBUSH, W. E. Impact of body mass index values on sperm quantity and quality. **J Androl**, v. 27, p. 450–452, 2006.
- KOSARI, S.; RATHNER, J. A.; BADOER, E. Central resistin enhances renal sympathetic nerve activity via phosphatidylinositol 3-kinase but reduces the activity to brown adipose tissue via extracellular signal-regulated kinase 1/2. **J. Neuroendocrinol**, v. 24, p. 1432–1439, 2012.
- KOSARI, S.; RATHNER, J. A.; CHEN, F.; KOSARI, S.; BADOER, E. Centrally administered resistin enhances sympathetic nerve activity to the hindlimb but attenuates the activity to brown adipose tissue. **Endocrinology**, v. 152, p. 2626–2633, 2011
- KRESSEL, G.; TRUNZ, B.; BUB, A. *et al.*, Systemic and vascular markers of inflammation in relation to metabolic syndrome and insulin resistance in adults with elevated atherosclerosis risk. **Atherosclerosis**, v. 202, n. 1, p. 263–271, 2009.
- KUNDSON, J. D.; PAYNE, G. A.; BORTBOUSE, L.; TUNE, J. D. Leptin and mechanisms of endothelial dysfunction and cardiovascular disease. **Curr Hypertens Rep**, v. 10, p. 434–439, 2008.
- LACAL, I.; VENTURA, R. Epigenetic inheritance: concepts, mechanisms and perspectives. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, p. 292, 2018.
- LAM, Y. Y.; HA, C. W.; HOFFMANN, J. M.; OSCARSSON, J.; DINUDOM, A.; MATHER, T. J.; *et al.* Effects of dietary fat profile on gut permeability and microbiota and their relationships with metabolic changes in mice. **Obesity (Silver Spring)**, v. 23, n. 7, p. 1429-39, 2015.
- LAWN, R. B.; ANDERSON, E. L.; SUDERMAN, M.; SIMPKIN, A. J.; GAUNT, T. R.; TESCHENDORFF, A. E.; WIDSCHWENDTER, M.; HARDY, R.; KUH, D.; RELTON, C. L.; HOWE, L. D. Psychosocial adversity and socioeconomic position during childhood and epigenetic age: analysis of two prospective cohort studies. **Hum Mol Genet.**, v. 27, n. 7, p. 1301–1308, 2018.



LEE, B.; SHAO, J. Adiponectin and energy homeostasis, **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 15, n. 2, p. 149–156, 2014.

LEE, S.; LEE, H.-C.; KWON, Y.-W.; LEE, S. E.; CHO, Y.; KIM, J.; *et al.* Adenylyl cyclase-associated protein 1 is a receptor for human resistin and mediates inflammatory actions of human monocytes. **Cell Metabol**, v. 19, p. 484–497, 2014b.

LEE, Y. S.; KIM, J. W.; OSBORNE, O.; OH, D. Y.; SASIK, R.; SCHENK, S.; CHEN, A.; CHUNG, H.; MURPHY, A.; WATKINS, S. M.; QUEHENBERGER, O.; JOHNSON, R. S.; OLEFSKY, J. M. Increased adipocyte O<sub>2</sub> consumption triggers HIF-1 $\alpha$ , causing inflammation and insulin resistance in obesity. **Cell**, v. 157, n. 6, p. 1339-1352, 2014a.

LI, T. L.; CHIOU, L. C.; LIN, Y. S.; HSIEH, J. R.; HWANG, L. L. Electrophysiological study on the effects of leptin in rat dorsal motor nucleus of the vagus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, p. R2136–R2143, 2007.

LIANG, C.; OEST, M. E.; PRATER, M. R. Intrauterine exposure to high saturated fat diet elevates risk of adult-onset chronic diseases in C57BL/6 mice. **Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol**, v. 86, n. 5, p. 377–384, 2009.

LIMA, F. B.; CURI, R. Moléculas ativas produzidas por órgãos não endócrinos. In: AIRES, M. M. Fisiologia, 4<sup>a</sup> edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2012.

LIN, C.; SHAO, B.; HUANG, H.; ZHOU, Y.; LIN, Y. Maternal high fat diet programs stress-induced behavioral disorder in adult offspring. **Physiol. Behav.**, v. 152, p. 119–127, 2015.

LISTER, R.; PELIZZOLA, M.; DOWEN, R. H.; HAWKINS, R. D.; HON, G.; TONTI-FILIPPINI, J.; NERY, J. R.; LEE, L.; YE, Z.; NGO, Q.-M.; EDSALL, L.; ANTOSIEWICZ-BOURGET, J.; STEWART, R.; RUOTTI, V.; MILLAR, A. H.; THOMSON, J. A.; REN, B.; ECKER, J. R. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. **Nature**, v. 462, p. 315–322, 2009.

LIU, G. Y.; LIANG, Q. H.; CUI, R. R.; LIU, Y.; WU, S. S.; SHAN, P. F.; YUAN, L. Q.; LIAO, E. Y. Leptin Promotes the Osteoblastic Differentiation of Vascular Smooth Muscle Cells From Female Mice by Increasing RANKL Expression. **Endocrinology**, v. 155, p. 558 – 567, 2014.

LOCHE, E.; BLACKMORE, H. L.; CARPENTER, A. A.; BEESON, J. H.; PINNOCK, A.; ASHMORE, T. J.; AIKEN, C. E.; ALMEIDA-FARIA, J.; SCHOONEJANS, J. M.; GIUSSANI, D. A.; FERNANDEZ-TWINN, D. S.; OZANNE, S. E. Maternal diet-induced obesity programmes cardiac dysfunction in male mice independently of post-weaning diet. **Cardiov. Res.**, v. 114, n. 10, p. 1372-84, 2018.

LOFFREDA, S.; YANG, S. Q.; LIN, H. Z.; KARP, C. L.; BRENGMAN, M. L.; WANG, D. J.; KLEIN, A. S.; BULKLEY, G. B.; BAO, C.; NOBLE, P. W.; LANE, M. D. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **FASEB J**, v. 12, p. 57–65, 1998.

LOUET, J. F.; LEMAY, C.; MAUVAIS-JARVIS, F. Antidiabetic actions of estrogen: insight from human and genetic mouse models. **Curr. Atheroscler. Rep.**, v. 6, p. 180 – 185, 2004.

LUCAS, A. Role of nutritional programming in determining adult morbidity. **Arch Dis Child**, v. 71, p. 288-290, 1994.

LUMENG, C. N.; BODZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. **J Clin Invest**, v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

LUZZO, K. M.; WANG, Q.; PURCELL, S. H.; CHI, M.; JIMENEZ, P. T.; GRINDLER, N.; SCHEDL, T.; MOLEY, K. H. High fat diet induced developmental defects in the mouse: oocyte meiotic aneuploidy and fetal growth retardation/brain defects. **PLoS ONE**, v. 7, p. e49217, 2012.

MAEDA, K.; OKUBO, K.; SHIMOMURA, I.; FUNAHASHI T.; MATSUZAWA, Y, Kenichi Matsubara, cDNA Cloning and Expression of a Novel Adipose Specific Collagen-like Factor, apM1 (Adipose Most Abundant Gene Transcript 1). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 221, n. 2, p. 286-289, 1996.

MANDY, M.; NYIRENDA, M. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. **International Health**, v. 10, n. 2, p. 66–70, 2018.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E.; JURADO-LÓPEZ, R.; VALERO-MUNÓZ, M.; BARTOLOMÉ, M. V.; BALLESTEROS, S.; LUACES, M.; BRIONES, A. M.; LÓPEZ-ANDRÉS, N.; MIANA, M.; CACHOFEIRO, V. Leptin induces cardiac fibrosis through galectin-3, mTOR and oxidative stress: potential role in obesity. **J Hypertens**, v. 32, n. 5, p. 1104-14, 2014.

MASSIERA, F.; SEYDOUX, J.; GELOEN, A.; *et al.* Angiotensinogen-deficient mice exhibit impairment of diet-induced weight gain with alteration in adipose tissue development and increased locomotor activity. **Endocrinology**, v. 142, p. 5220-5, 2001.

MASUYAMA, H.; MITSUI, T.; EGUCHI, T.; TAMADA, S.; HIRAMATSU, Y. The effects of paternal high-fat diet exposure on offspring metabolism with epigenetic changes in the mouse adiponectin and leptin gene promoters. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 311, p. e236-e245, 2016.

MATSUI, H.; YOKOYAMA, T.; TANAKA, C.; SUNAGA, H.; KOITABASHI, N.; TAKIZAWA, T.; ARAI, M.; KURABAYASHI, M. Pressure mediated hypertrophy and mechanical stretch up-regulate expression of the long form of leptin receptor (ObR-b) in rat cardiac myocytes. **BMC Cell Biol.**, v. 13, p. 37, 2012.

MATSUZAWA, Y. The metabolic syndrome and adipocytokines. **FEBS Letters**, v. 580, p. 2917-21, 2006.

MCALLISTER, E. J.; DHURANDHAR, N. V.; KEITH, S. W.; ARONNE, L. J.; BARGER, J.; BASKIN, M.; BENCA, R. M.; BIGGIO, J.; BOGGIANO, M. M.; EISENMANN, J. C.; ELOBEID, M.; FONTAINE, K. R.; GLUCKMAN, P.; HANLON, E. C.; KATZMARZYK, P.; PIETROBELLI, A.; REDDEN, D. T.; RUDEN, D. M.; WANG, C.; WATERLAND, R. A.; ALLISON, D. B. Ten putative contributors to the obesity epidemic. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 49, p. 868–913, 2009.

MCCANCE, R. A. Critical periods of growth. **Proc. Nutr. Soc**, v. 35, p. 309–313, 1976.

MCLAUGHLIN, T.; ACKERMAN, S. E.; SHEN, L.; ENGLEMAN, E. Role of innate and adaptive immunity in obesity-associated metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 127, n. 1, p. 5-13, 2017.

- MCPHERSON, N. O.; BELL, V. G.; ZANDER-FOX, D. L.; FULLSTON, T.; WU, L. L.; ROBKER, R. L.; LANE, M. When two obese parents are worse than one! Impacts on embryo and fetal development. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 309, p. E568 – E581, 2015.
- MENTING, M. D.; MINTJENS, S.; VAN DE BEEK, C.; FRICK, C. J.; OZANNE, S. E.; LIMPENS, J.; ROSEBOOM, T. J.; HOOIJMANS, C. R.; VAN DEUTKOM, A. W.; PAINTER, R. C. Maternal obesity in pregnancy impacts offspring cardiometabolic health: Systematic review and meta-analysis of animal studies. **Ob. Rev.**, v. 20, n. 5, p. 675-685, 2019.
- MEYER, L.; CASTON, J.; MENSAH-NYAGAN, A. G. Seasonal variation of the impact of a stressful procedure on open field behaviour and blood corticosterone in laboratory mice. **Behav Brain Res.**, v. 167, n. 2, p. 342-8, 2006.
- MISRA, A.; SHRIVASTAVA, U. Obesity and dyslipidemia in South Asians. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2708-2733, 2013.
- MITRA, A.; ALVERS, K. M.; CRUMP, E. M.; ROWLAND, N. E. Effect of high-fat diet during gestation, lactation, or postweaning on physiological and behavioral indexes in borderline hypertensive rats. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 296, p.R20–R28, 2009.
- MURRAY, S. A.; et al. Mouse gestation length is genetically determined. **PloS one**, v. 5, n. 8, 2010.
- NAKANO, Y.; TOBE T.; CHOI-MIURA, N. H.; *et al.* Isolation and characterization of GBP28, a novel gelatin-binding protein purified from human plasma. **J. Biochem**, v. 120, p. 803–812, 1996.
- NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM (NCEP). Expert Panel on Detection and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v. 106, p. 3143–3421, 2002.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (US) COMMITTEE FOR THE UPDATE OF THE GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8<sup>a</sup> edição. Washington (DC). National Academies Press (US), 2011.
- NERI, C.; EDLOW, A. G. Effects of Maternal Obesity on Fetal Programming: Molecular Approaches. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 2, a026591. 2015
- NG, S. F.; LIN, R. C.; LAYBUTT, D. R.; BARRES, R.; OWENS, J. A.; MORRIS, M. J. Chronic high-fat diet in fathers programs beta-cell dysfunction in female rat offspring. **Nature**, v. 467, p. 963-966, 2010.
- NICHOLAS, L. M.; OZANNE, S. E. Early life programming in mice by maternal overnutrition: mechanistic insights and interventional approaches. **Phil. Trans. R. Soc. B.**, v. 374, p. 20180116, 2019.

NISHIMURA, S.; MANABE, I.; NAGASAKI, M.; ETO, K.; YAMASHITA, H.; OHSUGI, M.; OTSU, M.; HARA, K.; UEKI, K.; SUGIURA, S.; YOSHIMURA, K.; KADOWAKI, T.; NAGAI, R. CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. **Nat Med.**, v. 15, n. 8, p. 914-20, 2009.

NIVOIT, P.; MORENS, C.; VAN ASSCHE, F.A.; JANSEN, E.; POSTON, L.; REMACLE, C.; REUSENS, B. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. **Diabetologia**, v. 52, p. 1133–1142, 2009.

O'REILLY, J. R.; REYNOLDS, R. M. The risk of maternal obesity to the long-term health of the offspring. **Clin Endocrinol (Oxf)**, v. 78, p. 9–16, 2013.

OH, D. Y.; OLEFSKY, J. M. Omega 3 fatty acids and GPR120. **Cell Metab**, v. 15, n. 5, p. 564-565, 2012.

OKEN, E.; RIFAS-SHIMAN, S. L.; FIELD, A.E.; FRAZIER, A. L.; GILLMAN, M. W. Maternal gestational weight gain and offspring weight in adolescence. **Obstet Gynecol**, v. 112, p. 999–1006, 2008.

OLAMOYEGUN, M. A.; OLUYOMBO, R.; ASAOLU, S. O. Evaluation of dyslipidemia, lipid ratios, and atherogenic index as cardiovascular risk factors among semi-urban dwellers in Nigeria. **Annals of African medicine**, v. 15, n. 4, p. 194–199, 2016.

OPOKU, S.; GAN, Y.; FU, W.; CHEN, D.; ADDO-YOBO, E.; TROFIMOVITCH, D.; YUE, W.; YAN, F.; WANG, Z.; LU, Z. Prevalence and risk factors for dyslipidemia among adults in rural and urban China: findings from the China National Stroke Screening and prevention project (CNSSPP). **BMC public health**, v. 19 n. 1, p. 1500, 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Tópicos em saúde: Obesidade, 2019. Disponível em: <http://www.who.int/topics/obesity/en/> [Acessado em Dez 2019]

ORNELLAS, F.; CARAPETO, P. V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Obese fathers lead to an altered metabolism and obesity in their children in adulthood: review of experimental and human studies. **Jornal de Pediatria**, v. 93, n. 6, p. 551–559, 2017.

ORNELLAS, F.; SOUZA-MELLO, V.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; AGUILA, M. B. Programming of obesity and comorbidities in the progeny: lessons from a model of diet-induced obese parents. **PLoS One**, v. 10, p. e124737, 2015.

OSMOND, C.; BARKER, D. J.; WINTER, P. D.; *et al.* Early growth and death from cardiovascular disease in women. **Br Med J**, v. 307, n. 6918, p. 1519-24, 1993.

ÖST, A.; LEMPRADL, A.; CASAS, E.; WEIGERT, M.; TIKO, T.; DENIZ, M.; PANTANO, L.; BOENISCH, U.; ITSKOV, P. M.; STOECKIUS, M.; RUF, M.; RAJEWSKY, N.; REUTER, G.; IOVINO, N.; RIBEIRO, C.; ALENIUS, M.; HEYNE, S.; VAVOURI, T.; POSPISILIK, J. A. Paternal diet defines offspring chromatin state and intergenerational obesity. **Cell**, v. 159, n. 6, p. 1352–1364, 2014.

PADILLA, J.; VIERIRA-POTTER, V. J.; JIA, G.; SOWERS, J. R. Role of perivascular adipose tissue on vascular reactive oxygen species in type 2 diabetes: A give and take relationship. **Diabetes**, v. 64, p. 1904-06, 2015.

- PANG, T. Y.; SHORT, A. K.; BREDY, T. W.; HANNAN, A. J. Transgenerational paternal transmission of acquired traits: stress-induced modification of the sperm regulatory transcriptome and offspring phenotypes. **Curr. Opin. Behav. Sci.**, v. 14, p. 140–147, 2017.
- PAPAIT, R.; CATTANEO, P.; KUNDERFRANCO, P.; GRECO, C.; CARULLO, P.; GUFFANTI, A.; VIGANÒ, V.; STIRPARO, G. G.; LATRONICO, M. V. G.; HASENFUSS, G.; CHEN, J.; CONDORELLI, G. Genome-wide analysis of histone marks identifying an epigenetic signature of promoters and enhancers underlying cardiac hypertrophy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 110, n. 50, p. 20164–20169, 2013.
- PARENTE, L. B.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. **Clin. Nutr.**, v. 27, p. 623–634, 2008.
- PARHAMI, F.; TINTUT, Y.; BALLARD, A.; FOGELMAN, A. M.; DEMER, L. L. Leptin enhances the calcification of vascular cells: artery wall as a target of leptin. **Circ Res**, v. 88, n. 9, p. 954-60, 2001.
- PARK, A., KIM, W. K., BAE, W-H. Distinction of white, beige and brown adipocytes derived from mesenchymal stem cells. **World J Stem Cells**, v. 26, n. 1, p. 33-42, 2014.
- PARK, E. J.; LEE, J. H.; YU, G-Y, HE. G.; ALI, S. R.; HOLZER R. G.; ÖSTERREICHER, C. H.; TAKAHASHI, H.; KARIN, M. Dietary and Genetic Obesity Promote Liver Inflammation and Tumorigenesis by Enhancing IL-6 and TNF Expression. **Cell**, v. 140, n. 2, p.197-208, 2010.
- PATANE, G.; CAPORARELLO, N.; MARCHETTI, P.; PARRINO, C.; SUDANO, D.; MARSELLI, L.; VIGNERI, R.; FRITTITTA, L. ADIPONECTIN increases glucose-induced insulin secretion through the activation of lipid oxidation. **Acta Diabetol**, v. 50, p. 852-857, 2013.
- PATEL, S. D.; RAJALA, M. W.; ROSSETTI, L.; SCHERER, P. E.; SHAPIRO, L. Disulfide-dependent multimeric assembly of resistin family hormones. **Science**, v. 304 , p. 1154-8, 2004.
- PATSCH, J. R.; MIESENBOCK, G.; HOPFERWIESER, T.; MUHLBERGER, V.; KNAPP, E.; DUNN, J. K.; GOTTO, A. M. JR.; PATSCH, W. Relation of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. **Arterioscler. Thromb**, v. 12, p. 1336–1345, 1992.
- PELEG-RAIBSTEIN, D.; LUCA, E.; WOLFRUM, C. Maternal high-fat diet in mice programs emotional behavior in adulthood. **Behav. Brain Res.**, v. 233, p. 398–404, 2012.
- PENTINAT, T.; RAMON-KRAUEL, M.; CEBRIA, J.; DIAZ, R.; JIMENEZ-CHILLARON, J. C. Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. **Endocrinology**, v. 151, p. 5617–5623, 2010.
- PERK, J.; DE BACKER, G.; GOHLKE, H.; GRAHAM, I.; REINER, Z.; VERSCHUREN, M.; ALBUS, C.; *et al.* European Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice (version 2012).The Fifth Joint Task Force of the European Society of Cardiology and Other Societies on Cardiovascular Disease Prevention in Clinical Practice (constituted by

representatives of nine societies and by invited experts). **Eur Heart J**, v. 33, p. 1635-701, 2012.

POSTON, L. Influence of maternal nutritional status on vascular function in the offspring. **Microcirculation**, v. 18, p. 256–262, 2012.

PRPIC, V.; WATSON, P. M.; FRAMPTON, I. C.; SABOL, M. A.; JEZEK, G. E.; GETTYS, T. W. Adaptive changes in adipocyte gene expression differ in AKR/J and SWR/J mice during diet-induced obesity. **J Nutr**, v. 132, p. 3325-32, 2002.

RACHED, F. H.; CHAPMAN, M. J.; KONTUSH, A. An overview of the new frontiers in the treatment of atherogenic dyslipidemias. **Clin Pharmacol Ther**, v. 96, p. 57-63, 2014.

RAJAPUROHITAM, V.; GAN, X. T.; KIRSHENBAUM, L. A.; KARMAZYN, M. The obesity associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. **Circ Res**, v. 93, p. 277–9, 2003.

RAJAPUROHITAM, V.; JAVADOV, S.; PURDHAM, D. M.; KIRSHENBAUM, L. A.; KARMAZYN, M. An autocrine role for leptin in mediating the cardiomyocyte hypertrophic effects of angiotensin II and endothelin-1. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 41, p. 265–274, 2006.

RANDO, O. J. Daddy Issues: Paternal Effects on Phenotype. **Cell**, v. 151, n. 4, p. 702 – 708, 2012.

REDDON, H.; GUÉANT, J. L.; MEYRE, D. The importance of gene-environment interactions in human obesity. **Clin Sci (Lond)**, v. 130, n. 18, p. 1571-1597, 2016.

REYNOLDS, R. M.; ALLAN, K. M.; RAJA, E. A.; BHATTACHARYA, S.; MCNEILL, G.; HANNAFORD, P. C.; SARWAR, N.; LEE, A. J.; BHATTACHARYA, S.; NORMAN J. E. Maternal obesity during pregnancy and premature mortality from cardiovascular event in adult offspring: Follow-up of 1 323 275 person years. **BMJ**, v. 347, f4539, 2013.

RODRIGUEZ, J. S.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, G. L.; REYES-CASTRO, L. A.; IBANEZ, C.; RAMIREZ, A.; CHAVIRA, R.; LARREA, F.; NATHANIELSZ, P. W.; ZAMBRANO, E. Maternal obesity in the rat programs male offspring exploratory, learning and motivation behavior: Prevention by dietary intervention pre-gestation or in gestation. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 30, p. 75–81, 2012.

RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, H.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-RAMÍREZ, G.; REYES-ROMERO, M. A. Obesity and inflammation: epidemiology, risk factors, and markers of inflammation. **Int J Endocrinol**, v. 2013, 678159, 2013.

ROEDER, L. M.; CHOW, B. F. Maternal undernutrition and its long-term effects on the offspring. **Am J Clin Nutr**, v. 25, n. 8, p. 812-21, Ago-1972.

ROSSMEISL, M.; RIM, J. S.; KOZA, R. A.; KOZAK, L. P. Variation in type 2 diabetes-related traits in mouse strains susceptible to diet-induced obesity. **Diabetes**, v. 52, p. 1958-66, 2003.

SAFONOVA, I.; AUBERT, J.; NEGREL, R.; AILHAUD, G. Regulation by fatty acids of angiotensinogen gene expression in preadipose cells. **Biochem J**, v. 322, p. 235-239, 1997.

- SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, v. 127, n. 1 p. 1-4, 2017.
- SAMUELSSON, A. M.; MATTHEWS, P. A.; ARGENTON, M.; CHRISTIE, M. R.; MCCONNELL, J. M.; JANSEN, E. H.; PIERSMA, A. H.; OZANNE, S. E.; TWINN, D. F.; REMACLE, C.; ROWLERSON, A.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: a novel murine model of developmental programming. **Hypertension**, v. 51, p. 383–392, 2008.
- SAMUELSSON, A. M.; MORRIS, A.; IGOSHEVA, N.; KIRK, S. L.; POMBO, J. M.; COEN, C. W.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. **Hypertension**, v. 55, n. 1, p. 76–82, 2010.
- SASAKI, A.; DE VEGA, W. C.; ST-CYR, S.; PAN, P.; MCGOWAN, P. O. Perinatal high fat diet alters glucocorticoid signaling and anxiety behavior in adulthood. **Neuroscience**, v. 240, p. 1–12, 2013.
- SASSON, I. E.; VITINS, A. P.; MAINIGI, M. A.; MOLEY, K. H.; SIMMONS, R. A. Pre-gestational vs gestational exposure to maternal obesity differentially programs the offspring in mice. **Diabetologia**, v. 58, p. 615 – 624, 2015.
- SATOH, N.; OGAWA, Y.; KATSUURA, G.; NUMATA, Y.; TSUJI, T.; HAYASE, M.; EBIHARA, K.; MASUZAKI, H.; HOSODA, K.; YOSHIMASA, Y.; NAKAO, K. Sympathetic Activation of Leptin via the Ventromedial Hypothalamus Leptin-Induced Increase in Catecholamine Secretion. **Diabetes**, v. 48, p. 1787–1793, 1999.
- SCHELLONG, K.; SCHULZ, S.; HARDER, T.; PLAGEMANN, A. Birth weight and long-term overweight risk: Systematic review and a meta-analysis including 643,902 persons from 66 studies and 26 countries globally. **PLoS ONE**, v. 7, p. e47776, 2012.
- SCHERER, P. E. The Multifaceted Roles of Adipose Tissue—Therapeutic Targets for Diabetes and Beyond: The 2015 Banting Lecture. **Diabetes**, v. 65, p. 1452-1461, 2016.
- SCHERER, P. E.; WILLIAMS, S.; FOGLIANO, M.; BALDINI, G.; LODISH, H. F. A Novel Serum Protein Similar to C1q, Produced Exclusively in Adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 26746-26749, 1995.
- SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.. O enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis: um desafio para a sociedade brasileira. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v. 20, n. 4, 2011
- SEIBENHENER, M. L.; WOOTEN, M. C. Use of the open field maze to measure locomotor and anxiety-like behavior in mice. **J. Vis. Exp. JoVE**, v. 96, p. e52434, 2015.
- SHANKAR, K.; HARRELL, A.; LIU, X.; GILCHRIST, J. M.; RONIS, M. J.; BADGER, T. M. Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 294, p. R528–R538, 2008.
- SHARP, G. C.; LAWLOR, D. A. Paternal impact on the life course development of obesity and type 2 diabetes in the offspring. **Diabetologia**, v. 62, p. 1802–1810, 2019.

- SHI, H.; KOKOEVA, M. V.; INOUE, K.; TZAMELI, I.; YIN, H.; FLIER, J. S. TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 116 , n. 11, p. 3015-3025, 2006.
- SIERRA-HONIGMANN, M. R.; NATH, A. K.; MURAKAMI, C.; GARCIA-CARDENA, G.; PAPAPETROPOULOS, A.; SESSA, W. C.; MADGE, L. A.; SCHECHNER, J. S.; SCHWABB, M. B.; POLVERINI, P. J.; FLORES-RIVEROS, J. R. Biological action of leptin as an angiogenic factor. **Science**, v. 281, p. 1683–1686, 1998.
- SIMMERMAN, H. K.; JONES, L. R. Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. **Physiol Rev**, v. 78, p. 921–947, 1998.
- SIMMONS, R. Developmental origins of adult metabolic disease: concepts and controversies. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, p. 390-394, 2005.
- SIMONNET, A.; CHETBOUN, M. ; POISSY, J. ; RAVERDY, V. ; NOULETTE, J. ; DUHAMEL, A.; *et al.* High prevalence of obesity in severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) requiring invasive mechanical ventilation. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 28, n.7, p. 1195–1199, 2020.
- SKAZNIK-WIKIEL, M. E.; SWINDLE, D. C.; ALLSHOUSE, A. A.; POLOTSKY, A. J.; MCMANAMAN, J. L. High-fat diet causes subfertility and compromised ovarian function independent of obesity in mice. **Bio. Rep.**, v. 94, n. 5, p. 108, 2016.
- SKINNER, M. K. What is an epigenetic transgenerational phenotype? F3 or F2. **Reprod. Toxicol.**, v. 25, p. 2–6, 2008.
- SOARES, T. S.; ANDREOLLA, A. P.; MIRANDA, C. A.; KLÖPPEL, E.; RODRIGUES, L. S.; MORAES-SOUZA, R. Q.; DAMASCENO, D. C.; VOLPATO, G. T.; CAMPOS, K. E. Effect of the induction of transgenerational obesity on maternal-fetal parameters. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 64, n. 1, p. 51-59, 2018.
- SONNENBURG, J. L.; BACKHED, F. Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 56-64, 2016.
- SPARANO, S.; AHRENS, W.; DE HENAUW, S.; MARILD, S.; MOLNAR, D.; MORENO, L. A.; SULING, M.; TORNARITIS, M.; VEIDEBAUM, T.; SIANI, A.; *et al.* Being macrosomic at birth is an independent predictor of overweight in children: Results from the IDEFICS study. **Matern Child Health J**, v. 17 p. 1373–1381, 2013.
- SPEIGHT, A.; DAVEY, W. G.; MCKENNA, E.; VOIGT, J. W. Exposure to a maternal cafeteria diet changes open-field behaviour in the developing offspring. **Int. J. Dev. Neurosci.**, v. 57, p. 34–40, 2017.
- SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiol. Rev.**, v. 72, p. 825–852, 1992.
- SPRUIJT, B. M.; WELBERGEN, P.; BRAKKEE, J.; GISPEN, W. H. An ethological analysis of excessive grooming in young and aged rats. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 525, p. 89-100, 1988.



- SRIDHAR, S. B.; DARBINIAN, J.; EHRLICH, S. F.; MARKMAN, M. A.; GUNDERSON, E. P.; FERRARA, A.; HEDDERSON, M. M. Maternal gestational weight gain and offspring risk for childhood overweight or obesity. **Am J Obstet Gynecol**, v. 211 p. e251– e258, 2014.
- SRINIVASAN, M.; KATEWA, S. D.; PALANIYAPPAN, A.; PANDYA, J. D.; PATEL, M. S. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. **Am. J. Physiol. Endocrin. Metab.**, v. 29, n. 4, p. E792–E799, 2006.
- STEFAN, E.; RAYMOND, N.; ARYA, M. S. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. **Hypertension**, v. 35, p. 1270-1277, 2000.
- STEPPAN, C. M.; BAILEY, S. T.; BHAT, S.; BROWN, E. J.; BANERJEE, R. R.; WRIGHT, C. M.; *et al.* The hormone resistin links obesity to diabetes. **Nature**, v. 409, p. 307–312, 2001.
- STRANAHAN, A. M.; NORMAN, E. D.; LEE, K.; *et al.* Diet-induced insulin resistance impairs hippocampal synaptic plasticity and cognition in middle-aged rats. **Hippocampus**, v. 18, p. 1085-1088, 2008.
- STUNKARD, A. J.; FOCH, T. T.; HRUBEC, Z. A twin study of human obesity. **JAMA**, v. 256, p. 51–54, 1986.
- SULLIVAN, E. L.; GRAYSON, B.; TAKAHASHI, D.; ROBERTSON, N.; MAIER, A.; BETHEA, C. L.; SMITH, M. S.; COLEMAN, K.; GROVE, K. L. Chronic consumption of a high-fat diet during pregnancy causes perturbations in the serotonergic system and increased anxiety-like behavior in nonhuman primate offspring. **J. Neurosci.**, v. 30, p. 3826–3830, 2010.
- SURWIT, R. S.; FEINGLOS, M. N.; RODIN, J.; SUTHERLAND, A.; PETRO, A. E.; OPARA, E. C.; KUHN, C. M.; REBUFFE-SCRIVE, M. Differential effects of fat and sucrose on the development of obesity and diabetes in C57BL/6J and A/J mice. **Metabolism**, v. 44, p. 645-651, 1995.
- T., BAKE; M., MURPHY; D.G.A., MORGAN; J.G., MERCER. Large, binge-type meals of high fat diet change feeding behaviour and entrain food anticipatory activity in mice. **Appetite**, v. 77, p. 62-73, 2014.
- TAJMIR, P.; CEDDIA, R. B.; LI, R. K.; COE, I. R.; SWEENEY, G. Leptin increases cardiomyocyte hyperplasia via extracellular signal-regulated kinase- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent signaling pathways. **Endocrinology**, v. 145, n. 4, p. 1550-5, 2004.
- TAK, Y. G.; FARNHAM, P. J. Making sense of GWAS: using epigenomics and genome engineering to understand the functional relevance of SNPs in non-coding regions of the human genome. **Epigenetics & Chromatin**, v. 8, p. 57, 2015.
- TANAKA, S. I.; ISODA, F.; ISHIHARA, Y.; KIMURA, M.; YAMAKAWA, T. T lymphopaenia in relation to body mass index and TNF- $\alpha$  in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. **Clinical endocrinology**, v. 54, n. 3, p. 347-354, 2001.

TARKOWSKI, A.; BJERSING, J.; SHESTAKOV, A.; BOKAREWA, M. I. Resistin competes with lipopolysaccharide for binding to toll-like receptor 4. **J. Cell. Mol. Med**, v. 14, p. 1419–1431, 2010.

TARTAGLIA, L. A.; DEMBSKI, M.; WENG, X.; DENG, N.; CULPEPPER, J.; DEVOS, R.; RICHARDS, G. J.; CAMPFIELD, L. A.; CLARK, F. T.; DEEDS, J.; MUIR, C.; SANKER, S.; MORIARTY, A.; MOORE, K. J.; SMUTKO, J. S.; MAYS, G. G.; WOOL, E. A.; MONROE, C. A.; TEPPER, R. I. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OBR. **Cell**, v. 83, p. 1263-71, 1995.

TARTOF, S. Y.; QIAN, L.; HONG, V.; WEI, R.; NADJAFI, R. F.; FISCHER, H.; *et al.* Obesity and mortality among patients diagnosed with COVID-19: results from an integrated health care organization. **Annals of Internal Medicine**, M20-3742.

THAMOTHARAN, M.; GARG, M.; OAK, S.; ROGERS, L. M.; PAN, G.; SANGIORGI, F.; LEE, P. W.; DEVASKAR, S. U. Transgenerational inheritance of the insulin-resistant phenotype in embryo-transferred intrauterine growth-restricted adult female rat offspring. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 292, p. E1270–E1279, 2007.

THATCHER, S.; YIANNIKOURIS, F.; GUPTE, M.; CASSIS, L. The adipose renin-angiotensin system: role in cardiovascular disease. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 302, n. 2, p. 111–117, 2009.

THORP, A. A.; SCHLAICH, M. P. Relevance of sympathetic nervous system activation in obesity and metabolic syndrome. **J. Diabetes Res**, v. 2015, 341583, 2015.

TORTORIELLO, D. V.; MCMINN, J.; CHUA, S. C. Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice. **Endocrinology**, v. 145, p. 1238–1247, 2004.

TRZECIAK-RYCZEK, A.; TOKARZ-DEPTUŁA, B.; DEPTUŁA, W. Adipocytokines affecting the immune system – selected data. **Centr Eur J Immunol**, v. 36, p. 92-4, 2011.

TUNE, J. D.; GOODWILL, A. G.; SASSOON, D. J.; MATHER, K. J. Cardiovascular consequences of metabolic syndrome. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine**, v. 183, p. 57–70, 2017.

UHLEY, V.E.; JEN, K.L. Changes in feeding efficiency and carcass composition in rats on repeated high-fat feedings. **Int. J. Obesity**, v. 13, p. 849-856, 1989.

VALVASSORI, S. S.; VARELA, R. B.; QUEVEDO, J. Animal models of mood disorders: focus on bipolar disorder and depression. In: CONN, P. M. Animal models for study of human disease, 2<sup>a</sup> edição. Elsevier, USA, 2017.

VAN ABELEN, A. F.; DE ROOIJ, S. R.; OSMOND, C.; PAINTER, R. C.; VEENENDAAL, M. V.; BOSSUYT, P. M.; ELIAS, S. G.; GROBBEE, D. E.; VAN DER SCHOUW, Y. T.; BARKER, D. J.; ROSEBOOM, T. J. The sex-specific effects of famine on the association between placental size and later hypertension. **Placenta**, v. 32, p. 694-698, 2011.

- VAN OTTERDIJK, S. D.; MATHERS, J. C.; STRATHDEE, G. Do age related changes in DNA methylation play a role in the development of age-related diseases? **Biochem. Soc. Trans.**, v. 41, p. 803–807, 2013.
- VAN OTTERDIJK, S.; MICHELS, B. K. Transgenerational epigenetic inheritance in mammals: how good is the evidence? **FASEB J.**, v. 30, p. 2457–2465, 2016.
- VIDO, D. S.; NEJM, M. B.; SILVA, N. R.; SILVA, S. M. A.; CRAVO, S. L.; LUZ, J. Maternal obesity and late effects on offspring metabolism. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 58, p. 3, 2014.
- VOGLER, G.; BODMER, R. Cellular mechanisms of *Drosophila* heart morphogenesis. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 2, n. 1, p. 2-16, 2015.
- VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425, 2006.
- WADDELL, J.; MCCARTHY, M. M. Sexual differentiation of the brain and ADHD: what is a sex difference in prevalence telling us? **Curr. Top. Behav. Neurosci**, v. 9, p. 341-360, 2012.
- WAKE, M.; NICHOLSON, J. M.; HARDY, P., SMITH, K. Preschooler obesity and parenting styles of mothers and fathers: Australian national population study. **Pediatrics**, v. 120, n. 6, p. e1520–e1527, 2007.
- WALKER, C. L.; HO, S. M. Developmental reprogramming of cancer susceptibility. **Nat. Rev. Cancer**, v. 12, p. 479-486, 2012.
- WANG, J.; FREIRE, D.; KNABLE, L.; *et al.* Childhood and adolescent obesity and long-term cognitive consequences during aging. **J. Comp. Neurol.**, v. 523, p. 757-768, 2015.
- WANG, J.; WANG, H.; LUO, W.; GUO, C.; WANG, J.; CHEN, Y. E.; CHANG, L.; EITZMAN, D.T. Leptin-Induced Endothelial Dysfunction Is Mediated by Sympathetic Nervous System Activity. **J Am Heart Assoc**, v. 2, p. e000299, 2013.
- WANG, Y.; YANG, M.; HUANG, Z.; TIAN, L.; NIU, L.; XIAO, S. Urinary cotinine concentrations in preschool children showed positive associations with smoking fathers. **Acta Paediatr.**, v.106, n. 1, p. 67–73, 2017.
- WATKINS, A. J.; SINCLAIR, K. D. Paternal low protein diet affects adult offspring cardiovascular and metabolic function in mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, n. 306, p. H1444 – H1452, 2014.
- WELTER, D.; MACARTHUR, J.; MORALES, J.; BURDETT, T.; HALL, P.; JUNKINS, H.; KLEMM, A.; FLICEK, P.; MANOLIO, T.; HINDORFF, L.; PARKINSON, H. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. D1001–D1006, 2014.
- WHITE, C. L.; PURPERA, M. N.; MORRISON, C. D. Maternal obesity is necessary for the programming effect of a high-fat diet on offspring. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, v. 296, p. R1464–R1472, 2009.

- WIJESEKARA, N.; KRISHNAMURTHY, M.; BHATTACHARJEE, A.; SUHAIL, A.; SWEENEY, G.; WHEELER, M. B. Adiponectin-induced ERK and Akt phosphorylation protects against pancreatic beta cell apoptosis and increases insulin gene expression and secretion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 44, p. 33623–33631, 2010.
- WILLIAMS, K. W.; ZSOMBOK, A.; SMITH, B. N. Rapid Inhibition of Neurons in the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus by Leptin. **Endocrinology**, v. 148, n.4, p. 1868–1881, 2007.
- WILLIAMS, L. M.; CAMPBELL, F. M.; DREW, J. E.; KOCH, C.; HOGGARD, N.; *et al.* The development of diet-induced obesity and glucose intolerance in C57BL/6 mice on a high-fat diet consists of distinct phases. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e106159, 2014.
- WILSON, R. C.; VACEK, T.; LANIER, D. L.; DEWSBURY, D. A. Open-field behavior in muroid rodents. **Behavioral Biology**, v. 17, n. 4, p. 495–506, 1976.
- WISNIEWSKI, P. J.; DOWDEN, R. A.; CAMPBELL, S. C. Role of Dietary Lipids in Modulating Inflammation through the Gut Microbiota. **Nutrients**, v. 11, p; 117, 2019.
- WOFFORD, M. R.; HALL, J. E. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 29, p. 3621–3637, 2004.
- WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; RUSHING, P. A.; D'ALESSIO, D.; TSO, P. A controlled high-fat diet induces an obese syndrome in rats. **J Nutr**, v. 133, n. 4, p. 1081–7, 2003.
- WRIGHT, T.; LANGLEY-EVANS, S. C.; VOIGT, J. P. The impact of maternal cafeteria diet on anxiety-related behavior and exploration in the offspring. **Physiol. Behav.**, v. 103, p. 164–172, 2011.
- WU, H.; BALLANTYNE, C. M. Skeletal muscle inflammation and insulin resistance in obesity. **J Clin Invest**. v. 127, n. 1, p. 43-54, 2017.
- WU, H.; HAUSER, R.; KRAWETZ, S. A.; PILSNER, J. R. Environmental susceptibility of the sperm epigenome during windows of male germcell development. **Curr. Environ. Health Rep.**, v. 2, p. 356-66, 2015.
- WU, X.; MOTOSHIMA, H.; MAHADEV, K.; STALKER, T. J.; SCALIA, R.; GOLDSTEIN, B. J. Involvement of AMP-activated protein kinase in glucose uptake stimulated by the globular domain of adiponectin in primary rat adipocytes. **Diabetes**, v. 52, n. 6, p. 1355–1363, 2003.
- XIAO, R. P. Cell logic for dual coupling of a single class of receptors to Gs and Gi proteins. **Circ Res**, v. 87, p. 635–637, 2000.
- XU, W. L.; ATTI, A. R.; GATZ, M.; PEDERSEN, N. L.; JOHANSSON, B.; FRATIGLIONI, L. Midlife overweight and obesity increase late-life dementia risk a population-based twin study. **Neurology**, v. 76, p. 1568-1574, 2011b.
- XU, Y.; ELMQUIST, J. K.; FUKUDA, M. Central nervous control of energy and glucose balance: focus on the central melanocortin system. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1243, p. 1-14, 2011a.

YAMAUCHI, T.; KAMON, J.; ITO, Y.; TSUCHIDA, A.; YOKOMIZO, T.; KITA, S.; SUGIYAMA, T.; MIYAGISHI, M.; HARA, K.; TSUNODA, M.; *et al.* Cloning of adiponectin receptors that mediate antidiabetic metabolic effects. **Nature**, v. 423, p. 762-769, 2003.

YANG, R. Z.; HUANG, Q.; XU, A.; MCLENITHAN, J. C.; EISEN, J. A.; SHULDINER, A. R.; *et al.* Comparative studies of resistin expression and phylogenomics in human and mouse. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 310, p. 927–935, 2003.

YE, R.; SCHERER, P. E. Adiponectin, driver or passenger on the road to insulin sensitivity? **Molecular Metabolism**, v. 2, n. 3, p. 133–141, 2013.

YOKOMIZO, H.; INOGUCHI, T.; SONODA, N.; SAKAKI, Y.; MAEDA, Y.; INOUE, T.; HIRATA, E.; TAKEI, R.; IKEDA, N.; FUJII, M.; FUKUDA, K.; SASAKI, H.; TAKAYANAGI, R. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic beta-cell function in adult offspring with sex differences in mice. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 306, p. E1163 – E1175, 2014.

YOO, S. R.; KIM, Y. J.; PARK, D. Y.; JUNG, U. J.; JEON, S. M.,; AHN, Y.T.; *et al.* Probiotics *L. plantarum* and *L. curvatus* in combination alter hepatic lipid metabolism and suppress diet-induced obesity. **Obesity (Silver Spring)**, v. 21, n. 12, p. 2571-8, 2013.

YUDKIN, J. S.; STEHOUWER, C. D. A.; EMEIS, J. J.; COPPACK, S. W. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19, n. 4, p. 972–978, 1999.

YVAN-CHARVET, L.; EVEN, P.; BLOCH-FAURE, M.; *et al.* Deletion of the angiotensin type 2 receptor reduces adipose cell size and protects from diet-induced obesity and insulin resistance. **Diabetes**, v. 54, p. 991-9, 2005.

ZECA, S. G. Efeito do consumo materno de dieta hiperlipídica sobre a função cardíaca da prole jovem. 2015. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas)- Instituto de Biologia. **Universidade Federal Rural o Rio de Janeiro**. Seropédica. 2015.

ZHANG, L., XIONG, X. Q.; FAN, Z. D.; GAN, X. B.; GAO, X. Y.; ZHU, G. Q. Involvement of enhanced cardiac sympathetic afferent reflex in sympathetic activation in early stage of diabetes. **J. Appl. Physiol**, v. 113, p. 47-55, 2012.

ZHAO, X. L.; GUTIERREZ, L.M.; CHANG, C.F.; HOSEY, M. M. The alpha 1-subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 198, p. 166–173, 1994.

ZHOU, Y.; ZHU, H.; WU, H. Y.; JIN, L. Y.; CHEN, B.; PANG, H. Y.; MING, Z. H.; CHENG, Y.; ZHOU, C. L.; GUO, M. X.; HUANG, Y. T.; YU, D. Q.; SHENG, J. Z.; HUANG, H. F. Diet-Induced Paternal Obesity Impairs Cognitive Function in Offspring by Mediating Epigenetic Modifications in Spermatozoa. **Obesity (Silver Spring, Md.)**, v. 26, n. 11, p. 1749–1757, 2018.

## 9. ANEXOS

### ANEXO A

Valores numéricos dos experimentos relacionados ao protocolo experimental de obesidade materna induzida por dieta hiperlipídica.

**Tabela 1:** Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos fêmeas, após 6 semanas de fornecimento de dietas hiperlipídicas. Valores referentes às análises de ressonância magnética nuclear de composição corporal e teste de tolerância à glicose.

Grupo	Massa corporal (g)		Massa gorda (g)		Massa magra (g)		AUC (UA)	
	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	20,72 ± 0,24	34	2,36 ± 0,11	34	17,28 ± 0,20	34	25735 ± 662,4	8
HF45	22,29 ± 0,35 **	31	3,69 ± 0,27 ***	31	17,61 ± 0,17	31	30711 ± 1083 **	10
HF60	24,79 ± 0,38 ***	35	5,78 ± 0,32 ****	35	18,17 ± 0,14 ***	35	30136 ± 865,6 **	13

C: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% de energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% de energia proveniente de lipídeos. AUC: área sobre a curva. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais. *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \*\* p < 0, 01; \*\*\* p = 0,001; \*\*\*\*p < 0,001; NC vs HF45 ou HF60.

**Tabela 2:** Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos fêmeas, após 6 semanas de fornecimento de dietas hiperlipídicas. Valores referentes ao teste comportamental de campo aberto em fêmeas submetidas ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta, na 10ª semana de idade.

Grupo	Distância total percorrida (cm)		Tempo no centro (s)		Tempo de duração do grooming (s)	
	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	19923 ± 608	13	500,7 ± 52,46	13	154,8 ± 15,78	13
HF45	19126 ± 1036	14	595 ± 53,94	14	139,6 ± 15,06	14
HF60	17824 ± 801,9	18	419,2 ± 43,03	18	248,1 ± 28,09 *	18

NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% de energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% de energia proveniente de lipídeos. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais. *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*; \* p < 0,05; NC vs HF60.

**Tabela 3:** Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos fêmeas, após 6 semanas de fornecimento de dietas hiperlipídicas. Valores de taxa de nascimento (em percentual), número de filhotes e taxa de sobrevivência dos filhotes ao final da lactação (em percentual) de fêmeas submetidas ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta.

Grupo	Taxa de nascimento (%)		Número de filhotes		Taxa de sobrevivência (%)	
	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	45,3 ± 2,9	13	7,3 ± 0,3	13	98,97 ± 0,55	13
HF45	45 ± 2,9	14	6,9 ± 0,1	14	89,63 ± 6,19	14
HF60	49,5 ± 3,5	18	6 ± 0,34	18	48,33 ± 15,47 *	18

NC:

grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% de energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% de energia proveniente de lipídeos. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais. *One way ANOVA, Sidak post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; NC vs HF60.

**Tabela 4:** Valores de massa corporal das proles F1 e F2 de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as semanas 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> de idade

Massa corporal (g)		Machos				Fêmeas			
		Geração F1		Geração F2		Geração F1		Geração F2	
Idade (semanas)	Grupo	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
6	NC	22,1 ± 0,5	13	22,6 ± 0,3	20	18,3 ± 0,3	15	17,7 ± 0,2	17
	MHF45	22,9 ± 0,4	12	21,6 ± 0,3	9	18,1 ± 0,2	15	18,3 ± 0,3	17
	MHF60	21,3 ± 0,2	8	20,4 ± 0,4****	10	17,7 ± 0,5	5	17,4 ± 0,4	8
10	NC	26,5 ± 0,6	18	26,6 ± 0,7	15	20,7 ± 0,3	25	17,7 ± 0,5	15
	MHF45	27,1 ± 0,4	19	24,7 ± 0,6	9	21,4 ± 0,4	18	19,9 ± 0,3	17
	MHF60	26,6 ± 0,2	8	22,8 ± 0,4	10	20,3 ± 0,4	4	18,8 ± 0,4	8
15	NC	29,6 ± 1,0	14	31,9 ± 1,0	10	23,1 ± 0,5	15	23,8 ± 0,7	10
	MHF45	31,6 ± 0,9	14	29,4 ± 1,0	4	22,8 ± 0,4	16	22,9 ± 0,8	6
	MHF60	29,6 ± 0,5	8	29,6 ± 0,5	8	23,0 ± 0,8	5	23,0 ± 0,8	5
25	NC	32,8 ± 1,0	14	37,8 ± 1,3	15	25,3 ± 0,4	27	24,9 ± 1,0	11
	MHF45	36,6 ± 0,7****	15	34,2 ± 1,5*	4	25,2 ± 0,7	17	26,2 ± 1,4	6
	MHF60	33,2 ± 0,8	8	NA	NA	26,2 ± 1,4	5	NA	NA

NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; NA = não analisado. *One way ANOVA, Tukey post hoc*; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; NC vs MHF45 ou MHF60.

**Tabela 5:** Valores de massa gorda das proles F1 e F2 de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as semanas 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> de idade.

Massa gorda (g)		Machos				Fêmeas			
Idade (semanas)	Grupo	Geração F1		Geração F2		Geração F1		Geração F2	
		média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
6	NC	1,6 ± 0,1	13	1,6 ± 0,1	20	1,8 ± 0,1	15	1,7 ± 0,1	17
	MHF45	2,1 ± 0,1	12	1,7 ± 0,1*	9	2,4 ± 0,1****	15	2,0 ± 0,1	17
	MHF60	1,8 ± 0,1	8	1,5 ± 0,1	10	2,0 ± 0,1	5	2,1 ± 0,1	8
10	NC	2,5 ± 0,2	18	3,1 ± 0,3	15	2,4 ± 0,1	25	2,5 ± 0,2	15
	MHF45	4,1 ± 0,2***	19	2,7 ± 0,3	9	3,3 ± 0,3	18	2,5 ± 0,1	17
	MHF60	2,5 ± 0,2	8	2,3 ± 0,2	10	2,7 ± 0,3	4	2,1 ± 0,2	8
15	NC	3,8 ± 0,4	14	5,9 ± 0,7	10	3,1 ± 0,3	15	4,3 ± 0,5	10
	MHF45	6,7 ± 0,5****	14	3,9 ± 0,5	4	3,6 ± 0,3	16	3,0 ± 0,4	6
	MHF60	3,9 ± 0,3	8	3,9 ± 0,3	8	4,2 ± 0,6	5	4,2 ± 0,6	5
25	NC	6,3 ± 0,5	14	9,6 ± 1,2	15	4,2 ± 0,3	27	6,8 ± 0,9	11
	MHF45	10,5 ± 0,5****	15	7,1 ± 1,2	4	5,3 ± 0,5	17	5,4 ± 1,0	6
	MHF60	6,6 ± 0,6	8	NA	NA	6,7 ± 1,1**	5	NA	NA

NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; NA = não analisado. One way ANOVA, Tukey post hoc; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p = 0,001; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs MHF45 ou MHF60.

**Tabela 6:** Valores de massa magra das proles F1 e F2 de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as semanas 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> de idade.

Massa magra (g)		Machos				Fêmeas			
Idade (semanas)	Grupo	Geração F1		Geração F2		Geração F1		Geração F2	
		média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
6	NC	19,2 ± 0,4	13	19,9 ± 0,3	20	15,4 ± 0,2	15	14,8 ± 0,2	17
	MHF45	19,6 ± 0,3	12	18,8 ± 0,4	9	14,6 ± 0,2	15	15,1 ± 0,2	17
	MHF60	18,5 ± 0,2	8	17,9 ± 0,5****	10	14,9 ± 0,4	5	14,5 ± 0,3	8
10	NC	22,8 ± 0,5	18	22,2 ± 0,4	15	17,1 ± 0,2	25	16,3 ± 0,3	15
	MHF45	21,8 ± 0,3	19	20,7 ± 0,5	9	16,8 ± 0,3	18	16,2 ± 0,3	17
	MHF60	22,8 ± 0,3	8	19,4 ± 0,4	10	16,5 ± 0,2	4	15,5 ± 0,3	8
15	NC	29,4 ± 0,8	14	24,7 ± 0,5	10	18,7 ± 0,3	15	18,3 ± 0,2	10
	MHF45	23,7 ± 0,6	14	24,4 ± 0,6	4	18,2 ± 0,3	16	18,5 ± 0,5	6
	MHF60	24,5 ± 0,5	8	24,5 ± 0,5	8	17,9 ± 0,3	5	17,9 ± 0,3	5
25	NC	25,4 ± 0,6	14	27,1 ± 0,6	15	19,8 ± 0,2	27	19,9 ± 0,4	11
	MHF45	24,8 ± 0,2	15	26,4 ± 0,6	4	18,7 ± 0,3**	17	19,7 ± 0,5	6
	MHF60	25,0 ± 0,4	8	NA	NA	18,2 ± 0,4*	5	NA	NA

NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; NA = não analisado. One way ANOVA, Tukey post hoc; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs MHF45 ou MHF60.



**Tabela 7:** Valores referentes à análise comportamental da prole macho e fêmea de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta na 15ª semana de idade, através do teste de campo aberto, por duas gerações subsequentes.

Grupo	Geração F1				Geração F2			
	Distância total percorrida (cm)		Tempo de centro (s)		Distância total percorrida (cm)		Tempo de centro (s)	
Machos	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	597 ± 39	13	34 ± 4	13	578 ± 42	10	40 ± 5	10
MHF45	660 ± 59	14	33 ± 4	14	624 ± 44	4	34 ± 2	4
MHF60	518 ± 20	8	35 ± 7	8	NA	NA	NA	NA
Fêmeas								
NC	622 ± 47	16	20 ± 3	16	576 ± 57	10	30 ± 5	10
MHF45	669 ± 38	16	38 ± 4 ***	16	637 ± 87	6	24 ± 5	6
MHF60	685 ± 137	5	25 ± 4	5	NA	NA	NA	NA

NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 4-13 animais/ grupo; Teste t ou One way ANOVA, Sidak post hoc; \*\*\* p = 0,001; NC vs MHF45 ou MHF60.

**Tabela 8:** Valores referentes à análise da função cardíaca de filhotes machos e fêmeas provenientes de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25ª semana de idade, na geração F1.

Grupo	Geração F1					
	Fração de ejeção (%)		Volume diastólico final (µL)		Volume sistólico final (µL)	
Machos	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	61,4 ± 3	9	63,5 ± 4,4	9	25,1 ± 3,1	9
MHF45	55,2 ± 4,8	7	71,7 ± 2,6	7	32,8 ± 4,2	7
MHF60	61,6 ± 6,5	5	52,8 ± 2,1	5	20,5 ± 4	5
Fêmeas						
NC	68 ± 2,1	16	46 ± 2,4	16	14,9 ± 1,3	16
MHF45	61,8 ± 3,5	13	46,2 ± 2,7	13	18,4 ± 2,3	13
MHF60	79,4 ± 5,7	3	41,2 ± 3,5	3	8,9 ± 2,9	3

NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 3-16 animais/ grupo; Teste t ou One-way ANOVA, Tukey post hoc.

**Tabela 9:** Valores referentes à análise da função cardíaca de filhotes machos e fêmeas provenientes de camundongos fêmeas submetidas ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25ª semana de idade, na geração F2.

Grupo	Geração F2					
	Fração de ejeção (%)		Volume diastólico final (µL)		Volume sistólico final (µL)	
Machos	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	67,5 ± 4,1	8	65,9 ± 2,3	8	21,5 ± 2,9	8
MHF45	51,6 ± 4 *	11	73,1 ± 6,9	11	35,2 ± 3,8 *	11
MHF60	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fêmeas						
NC	62,2 ± 2,6	8	52,2 ± 4,9	8	20,2 ± 3	8
MHF45	52,2 ± 4,9	6	58 ± 3,1	6	28 ± 3,5	6
MHF60	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NC: dieta controle; MHF45: Prole obtida do grupo materno em HF45; MHF60: Prole obtida do grupo materno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= 3-16 animais/ grupo; Teste t ou *One-way* ANOVA, Tukey post hoc; \* p < 0,05; NC vs MHF45 ou MHF60.

## ANEXO B

Valores numéricos dos experimentos relacionados ao protocolo experimental de obesidade paterna induzida por dieta hiperlipídica.

**Tabela 1:** Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta em camundongos machos, após 6 semanas de fornecimento de dieta hiperlipídica. Avaliação através do RMN em machos de 10 semanas de idade.

Grupo	Massa corporal (g)		Massa gorda (g)		Massa magra (g)		AUC (UA)	
	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	23,73 ± 0,61	12	2,42 ± 0,24	12	20,42 ± 0,65	12	28698 ± 1194	6
HF45	32,95 ± 0,85 ****	9	8,21 ± 0,73 ****	9	23,69 ± 0,30 ***	9	35849 ± 908,7 *	6
HF60	33,29 ± 1,05 ****	10	8,02 ± 0,49 ****	10	23,91 ± 0,49 ***	10	43034 ± 2584 ****	6

NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% da energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% da energia proveniente de lipídeos. AUC: área sobre a curva. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p = 0,001; \*\*\*\*p < 0,001; NC vs HF45 ou HF60.

**Tabela 2:** Análise comportamental de camundongos machos submetidos ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta antes do acasalamento, obtida através do teste de campo aberto, em machos de 10 semanas de idade, após 6 semanas de consumo de dieta hiperlipídica

Grupo	Distância total percorrida (cm)		Tempo no centro (s)		Tempo de duração do grooming (s)	
	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	14879 ± 649,4	8	306,7 ± 40,32	8	493,7 ± 92,31	8
HF45	15131 ± 862,6	7	240,2 ± 30,63	8	348,7 ± 56,61	8
HF60	13731 ± 1028	9	243,5 ± 55,63	8	305,4 ± 66,97	8

NC: grupo controle; HF45: grupo em dieta hiperlipídica contendo 45% da energia proveniente de lipídeos; HF60: grupo em dieta hiperlipídica contendo 60% da energia proveniente de lipídeos. AUC: área sobre a curva. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*.

**Tabela 3:** Valores de massa corporal das proles F1 e F2 de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as semanas 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> de idade.

Massa corporal (g)		Machos				Fêmeas			
Idade (semanas)	Grupo	Geração F1		Geração F2		Geração F1		Geração F2	
		média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
6	NC	22,1 ± 0,5	13	22,6 ± 0,3	20	18,3 ± 0,3	15	17,7 ± 0,2	17
	PHF45	23,0 ± 0,2	10	22,1 ± 0,3	12	19,2 ± 0,3	9	17,8 ± 0,2	12
	PHF60	22,7 ± 0,2	10	22,2 ± 0,4	9	18,8 ± 0,2	10	18,1 ± 0,2	9
10	NC	26,5 ± 0,6	18	26,6 ± 0,7	15	20,7 ± 0,3	25	17,7 ± 0,5	15
	PHF45	26,9 ± 0,3	26	26,6 ± 0,4	12	21,4 ± 0,3	19	20,3 ± 0,3	11
	PHF60	27,1 ± 0,5	10	23,8 ± 0,4	14	21,3 ± 0,3	10	19,3 ± 0,2	13
15	NC	29,6 ± 1,0	14	31,9 ± 1,0	10	23,1 ± 0,5	15	23,8 ± 0,7	10
	PHF45	31,7 ± 0,5	18	30,5 ± 0,4	12	23,4 ± 0,5	10	22,5 ± 0,4	12
	PHF60	30,7 ± 0,5	10	30,7 ± 0,5	10	23,1 ± 0,5	10	23,1 ± 0,5	10
25	NC	32,8 ± 1,0	14	37,8 ± 1,3	15	25,3 ± 0,4	27	27,1 ± 1,0	11
	PHF45	36,8 ± 0,5****	16	35,2 ± 0,6*	12	27,6 ± 0,8**	14	24,9 ± 0,4**	12
	PHF60	35,4 ± 0,6*	10	NA	NA	25,8 ± 0,7	10	NA	NA

NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; NA = não analisado. *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs PHF45 ou PHF60.

**Tabela 4:** Valores de massa gorda das proles F1 e F2 de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as semanas 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> de idade.

Massa gorda (g)		Machos				Fêmeas			
Idade (semanas)	Grupo	Geração F1		Geração F2		Geração F1		Geração F2	
		média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
6	NC	1,6 ± 0,1	13	1,6 ± 0,1	20	1,8 ± 0,1	15	1,7 ± 0,1	17
	PHF45	2,0 ± 0,1	10	1,7 ± 0,1	12	2,4 ± 0,2**	9	1,9 ± 0,1	12
	PHF60	1,5 ± 0,1	10	1,9 ± 0,2	9	1,9 ± 0,1	10	2,0 ± 0,1	9
10	NC	2,5 ± 0,2	18	3,1 ± 0,3	15	2,4 ± 0,1	25	2,5 ± 0,2	15
	PHF45	3,2 ± 0,2	26	3,1 ± 0,3	12	2,6 ± 0,2	19	2,1 ± 0,1	11
	PHF60	2,7 ± 0,3	10	2,5 ± 0,2	14	3,2 ± 0,2*	10	2,4 ± 0,1	13
15	NC	3,8 ± 0,4	14	5,9 ± 0,7	10	3,1 ± 0,3	15	4,3 ± 0,5	10
	PHF45	5,6 ± 0,3***	18	5,3 ± 0,5	12	3,3 ± 0,3	10	3,2 ± 0,3	12
	PHF60	4,3 ± 0,5	10	4,3 ± 0,5	10	3,9 ± 0,4	10	3,9 ± 0,4	10
25	NC	6,3 ± 0,5	14	9,6 ± 1,2	15	4,2 ± 0,3	27	6,8 ± 0,9	11
	PHF45	9,2 ± 0,4****	16	7,7 ± 0,6	12	6,4 ± 0,7**	14	4,2 ± 0,3**	12
	PHF60	7,1 ± 0,5	10	NA	NA	5,3 ± 0,6	10	NA	NA

NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; NA = não analisado. *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001; \*\*\*\* p < 0,001; NC vs PHF45 ou PHF60.

**Tabela 5:** Valores de massa magra das proles F1 e F2 de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, durante as semanas 6<sup>a</sup>, 10<sup>a</sup>, 15<sup>a</sup> e 25<sup>a</sup> de idade.

Massa magra (g)		Machos				Fêmeas			
		Geração F1		Geração F2		Geração F1		Geração F2	
Idade (semanas)	Grupo	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
6	NC	19,2 ± 0,4	13	19,9 ± 0,3	20	15,4 ± 0,2	15	14,8 ± 0,2	17
	PHF45	19,9 ± 0,3	10	19,4 ± 0,2	12	15,6 ± 0,2	9	15,0 ± 0,2	12
	PHF60	20,0 ± 0,2	10	19,3 ± 0,4	9	15,7 ± 0,2	10	15,2 ± 0,2	9
10	NC	22,8 ± 0,5	18	22,2 ± 0,4	15	17,1 ± 0,2	25	16,3 ± 0,3	15
	PHF45	22,6 ± 0,3	26	22,5 ± 0,2	12	17,6 ± 0,2	19	17,1 ± 0,2	11
	PHF60	23,3 ± 0,3	10	20,3 ± 0,3	14	16,9 ± 0,3	10	15,7 ± 0,2	13
15	NC	29,4 ± 0,8	14	24,7 ± 0,5	10	18,7 ± 0,3	15	18,3 ± 0,2	10
	PHF45	24,8 ± 0,4	18	24,0 ± 0,3	12	18,7 ± 0,3	10	18,3 ± 0,3	12
	PHF60	25,5 ± 0,5	10	25,5 ± 0,4	10	18,2 ± 0,3	10	18,2 ± 0,3	10
25	NC	25,4 ± 0,6	14	27,1 ± 0,6	15	19,8 ± 0,2	27	19,9 ± 0,4	11
	PHF45	26,0 ± 0,3	16	25,8 ± 0,5*	12	19,9 ± 0,3	14	19,4 ± 0,2	12
	PHF60	26,5 ± 0,3	10	NA	NA	18,9 ± 0,3	10	NA	NA

NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; NA = não analisado. *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; NC vs PHF45.

**Tabela 6:** Análise comportamental da prole macho (verde) e fêmea (azul) de camundongos machos submetidos ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta na 15<sup>a</sup> semana de idade, através do teste de campo aberto, na geração F1.

Grupo	Geração F1							
	Distância total percorrida (cm)		Tempo de centro (s)		Tempo de duração do rearing (s)		Tempo de duração do freezing (s)	
Machos	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	597 ± 39	13	34 ± 4	13	11 ± 1	13	106 ± 10	13
PHF45	656 ± 41	12	38 ± 4	12	16 ± 1 *	12	84 ± 10	12
PHF60	638 ± 45	10	33 ± 5	10	14 ± 1	10	94 ± 11	10
Fêmeas								
NC	622 ± 47	16	20 ± 3	16	8 ± 1	16	105 ± 6	16
PHF45	598 ± 62	9	35 ± 4 **	9	10 ± 1	9	97 ± 7	9
PHF60	525 ± 59	10	21 ± 3	10	7 ± 1	10	123 ± 7	10

NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; Teste t ou *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; NC vs PHF45 ou PHF60.

**Tabela 7:** Análise comportamental da prole macho (verde) e fêmea (azul) de camundongos machos submetidos ao protocolo experimental de obesidade induzida por dieta na 15ª semana de idade, através do teste de campo aberto, na geração F2.

Grupo	Geração F2							
	Distância total percorrida (cm)		Tempo de centro (s)		Tempo de duração do rearing (s)		Tempo de duração do freezing (s)	
Machos	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	578 ± 42	10	40 ± 5	10	15 ± 1	10	98 ± 7	10
PHF45	537 ± 39	12	34 ± 5	12	11 ± 1 *	12	105 ± 7	12
PHF60	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fêmeas								
NC	576 ± 57	10	30 ± 5	10	8 ± 1	10	118 ± 13	10
PHF45	650 ± 52	12	31 ± 4	12	7 ± 1	12	104 ± 12	12
PHF60	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; Teste t ou *One way ANOVA*, Sidak *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; NC vs PHF45 ou PHF60.

**Tabela 8:** Análise da função cardíaca de filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) provenientes de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25ª semana de idade, da geração F1.

Grupo	Geração F1					
	Fração de ejeção (%)		Volume diastólico final (µL)		Volume sistólico final (µL)	
Machos	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	61,4 ± 3	9	63,5 ± 4,4	9	25,1 ± 3,1	9
PHF45	62,1 ± 3,9	11	62,3 ± 3,2	11	29,8 ± 3,5	11
PHF60	55,5 ± 3,7	7	71,4 ± 4,8	7	32,3 ± 3,9	7
Fêmeas						
NC	68 ± 2,1	16	46 ± 2,4	16	14,9 ± 1,3	16
PHF45	67,3 ± 3,5	9	47,6 ± 2,8	9	16,1 ± 2,4	9
PHF60	62,8 ± 4,1	8	48,5 ± 3,1	8	18,1 ± 2,5	8

NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; Teste t ou *One way ANOVA*, Tukey *post hoc*.

**Tabela 9:** Análise da função cardíaca de filhotes machos (verde) e fêmeas (azul) provenientes de camundongos machos submetidos ao protocolo de obesidade induzida por dieta, através do ecocardiograma, na 25ª semana de idade, da geração F2.

Grupo	Geração F2					
	Fração de ejeção (%)		Volume diastólico final (µL)		Volume sistólico final (µL)	
Machos	média ± SEM	n	média ± SEM	n	média ± SEM	n
NC	67,5 ± 4,1	8	65,9 ± 2,3	8	21,5 ± 2,9	8
PHF45	52,6 ± 1,8 **	11	73,6 ± 3,2	11	35,2 ± 2,4 **	11
PHF60	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Fêmeas						
NC	62,2 ± 2,6	8	52,2 ± 4,9	8	20,2 ± 3	8
PHF45	49,6 ± 3,3 *	9	63,9 ± 3,9	9	32,5 ± 3,3 *	9
PHF60	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NC: dieta controle; PHF45: Prole obtida do grupo paterno em HF45; PHF60: Prole obtida do grupo paterno em HF60. Os resultados são expressos como média ± SEM; n= número de animais; Teste t ou *One way* ANOVA, Tukey *post hoc*; \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; NC vs PHF45 ou PHF60.