

**UFRRJ**

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

**DISSERTAÇÃO**

**Estresse Oxidativo e Via da Sinalização da Leptina no Coração da Prole: Os  
Efeitos do Consumo Materno de Dieta Hiperlipídica.**

**Ewerlane Pamplona de Sousa**

**2025**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**ESTRESSE OXIDATIVO E VIA DA SINALIZAÇÃO DA LEPTINA NO CORAÇÃO  
DA PROLE: OS EFEITOS DO CONSUMO MATERNO DE DIETA HIPERLIPÍDICA.**

**EWERLANE PAMPLONA DE SOUSA**

*Sob a Orientação da Professora*  
**Norma Aparecida Almeida Figueiredo de Oliveira**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Ciências Fisiológicas**, no  
Curso de Pós-Graduação Multicêntrico  
em Ciências Fisiológicas, Área de  
Concentração em Ciências Fisiológicas.

Seropédica, RJ.  
Fevereiro de 2025.

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

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

S725e Sousa, Ewerlane Pamplona de, 1978-  
Estresse oxidativo e via da sinalização da leptina  
no coração da prole: os efeitos do consumo materno de  
dieta hiperlipídica / Ewerlane Pamplona de Sousa. -  
Seropédica, 2025.  
90 f.: il.

Orientadora: Norma Aparecida Almeida Figueiredo de  
Oliveira. Dissertação(Mestrado). -- Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós  
graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, 2025.

1. Distúrbios do metabolismo . 2. Síndrome  
metabólica. 3. Obesidade. 4. Influências pré-natais .  
5. Coração - Doenças . I. Oliveira, Norma Aparecida  
Almeida Figueiredo de , 1976-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-graduação Multicêntrico em Ciências  
Fisiológicas III. Título.



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



TERMO N° 134/2025 - PPGMCF (12.28.01.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.009772/2025-04

Seropédica-RJ, 27 de fevereiro de 2025.

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

EWERLANE PAMPLONA DE SOUSA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/02/2025

Profª Drª Norma Aparecida Almeida Figueiredo de Oliveira (Membro Interno - UFRRJ)

Prof Dr Fabio Fagundes da Rocha (Membro Interno – UFRRJ)

Prof Dr Fabio da Silva de Azevedo Fortes (Membro Externo – UERJ)

*Documento não acessível publicamente*

*(Assinado digitalmente em 28/02/2025 13:15)*  
FABIO FAGUNDES DA ROCHA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptCF (12.28.01.00.00.48)  
Matrícula: ####195#7

*(Assinado digitalmente em 27/02/2025 17:03)*  
NORMA APARECIDA ALMEIDA FIGUEIREDO DE  
OLIVEIRA  
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR  
DeptCF (12.28.01.00.00.48)  
Matrícula: ####791#4

*(Assinado digitalmente em 12/03/2025 12:26)*  
FABIO DA SILVA DE AZEVEDO FORTES

*ASSINANTE EXTERNO*  
CPF: ####.###.627-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **134**, ano: **2025**,  
tipo: **TERMO**, data de emissão: **27/02/2025** e o código de verificação: **897bac3809**

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas que são minha base, minha inspiração e minha força. Aos meus pais, Edgard (*in memorian*) e Ana, por terem me ensinado o valor do conhecimento, da dedicação e da resiliência. Seu amor e apoio incondicional foram fundamentais em cada etapa dessa caminhada. Ao meu marido Fabrício, meu companheiro de vida, que esteve ao meu lado em cada desafio, acreditando em mim. Seu amor, paciência e incentivo tornaram este sonho possível. E aos meus filhos, Arthur e Ester, minha maior motivação. Que este trabalho seja um reflexo do meu esforço para construir um futuro melhor, repleto de oportunidades e aprendizados, e que vocês sempre acreditem na força dos seus próprios sonhos. Com todo o meu amor e gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A jornada do mestrado foi repleta de desafios, aprendizados e crescimento pessoal e acadêmico. Chegar até aqui não seria possível sem o apoio e a contribuição de pessoas especiais, às quais dedico minha mais profunda gratidão.

À minha mãe, Ana, pelo amor incondicional, pelo exemplo de força e determinação e por sempre acreditar no meu potencial. Seu apoio foi essencial para que eu chegassem até aqui.

Ao meu marido, Fabrício, meu companheiro de vida, por sua paciência, incentivo e compreensão em cada etapa dessa caminhada. Obrigada por estar ao meu lado, oferecendo suporte nos momentos difíceis e celebrando comigo cada conquista.

Aos meus irmãos, Ewerton e Ewerlin, minha eterna gratidão pelo carinho, companheirismo e apoio incondicional. Vocês sempre estiveram ao meu lado, torcendo por cada conquista e me incentivando a seguir em frente. Obrigada por serem parte essencial da minha caminhada, compartilhando momentos de alegria, desafios e superação.

À minha orientadora, Professora Norma, por sua dedicação, por compartilhar seu conhecimento com generosidade e por me guiar com sabedoria ao longo desta pesquisa. Sua orientação foi fundamental para a construção deste trabalho.

Aos professores que tive a honra de conhecer e aprender durante o mestrado, que contribuíram imensamente para minha formação acadêmica e científica. A cada um de vocês, minha sincera gratidão pelo ensinamento, inspiração e incentivo ao pensamento crítico e à pesquisa.

Aos colegas de mestrado, por compartilharem essa jornada, pelas trocas de experiências, pelo apoio mútuo e pela amizade construída ao longo do caminho.

Por fim, à minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado, oferecendo palavras de encorajamento e celebrando comigo cada conquista.

Agradeço às agências de fomento. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) e o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos vocês, meu mais sincero muito obrigada!

## RESUMO

SOUSA, Ewerlane. 92 p. **Estresse oxidativo e via da sinalização da leptina no coração da prole: os efeitos do consumo materno de dieta hiperlipídica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

O consumo alimentar contemporâneo está baseado em alimentos ultraprocessados, ricos em açúcar, gordura e sal, contribuindo para o aumento de doenças crônicas. Em nosso laboratório de investigação cardiometabólica trabalhamos com o conceito DOHAD (Origem do Desenvolvimento da Saúde e Doença), que estuda como a nutrição materna pode influenciar o desenvolvimento fetal aumentando o risco de doenças como obesidade, diabetes e doenças cardíacas ao longo da vida dos descendentes. A obesidade é frequentemente associada à doenças cardiovasculares e a hiperleptinemia, à alterações na contratilidade, função cardíaca e hipertensão arterial. Com isso, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito do consumo materno de dieta hiperlipídica (DH) sobre a expressão cardíaca de leptina, as proteínas envolvidas em sua via de sinalização celular e o estresse oxidativo no coração dos animais machos da prole ao desmame e na fase adulta. Para isso, ratas Wistar foram alimentadas com dieta normolipídica (9% de lipídeos, grupo C) ou dieta hiperlipídica (29% de lipídeos, grupo DH) durante 7 semanas antes do acasalamento, durante a gestação e lactação. Metade dos animais machos da prole foram eutanasiados em atmosfera de CO<sub>2</sub> no desmame (21 dias) e a outra metade recebeu dieta normolipídica *ad libitum* até os 180 dias de vida, quando foram eutanasiados com auxílio de guilhotina. Foram analisados peso corporal, peso de tecido adiposo branco visceral (retroperitoneal e epididimal) e subcutâneo (inguinal), peso do coração, concentração sérica de leptina, a produção cardíaca de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), assim como a expressão proteica dos componentes da via de sinalização da leptina (ObR, JAK-2, STAT-3, STAT-3p e SOCS-3) foi avaliada através da técnica de western blot e a expressão do RNAm para leptina foi avaliada por q-PCR (processo 017/2014 – CEUA-IB-UFRJ). O consumo materno de DH promoveu, aos 21 dias, aumento do peso corporal, maior adiposidade, hiperleptinemia e aumento da massa cardíaca, sugerindo hipertrofia do coração. Não foi observada diferença na expressão cardíaca do ObR entre as proles C e DH. Aos 180 dias, a prole DH apresentou aumento no peso corporal, maior adiposidade e hiperleptinemia, no entanto a massa cardíaca não diferiu da prole C. Observamos aumento na expressão proteica de ObR, JAK-2, STAT3, STAT-3p e redução na expressão proteica de SOCS-3. Não foi observado aumento na expressão cardíaca do RNAm de leptina. Além disso, verificamos aumento da produção cardíaca de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na prole DH adulta, sugerindo aumento do estresse oxidativo. Esses resultados sugerem que o consumo materno de DH promove obesidade, hiperleptinemia na fase neonatal e adulta dos ratos machos da prole. A super exposição do tecido cardíaco a esse hormônio pode promover, a longo prazo, doenças cardiovasculares. Além disso, o aumento na via da leptina e do estresse oxidativo no coração da prole adulta podem comprometer a função cardíaca. Desta forma, os resultados demonstram que a dieta hiperlipídica das matrizes durante a gestação e lactação pode promover disfunções metabólicas e cardiovasculares nas fases neonatal e adulta da prole.

**PALAVRAS-CHAVE:** programação metabólica, obesidade, hiperleptinemia.

## ABSTRACT

SOUSA, Ewerlane. 92 p. **Oxidative stress and leptin signaling pathway in the heart of offspring: the effects of maternal consumption of a high-fat diet.** Dissertation (Master's in Physiological Sciences). Institute of Biological and Health Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

Contemporary food consumption is based on ultra-processed foods, rich in sugar, fat and salt, contributing to the increase in chronic diseases. In our cardiometabolic research laboratory, we work with the DOHAD (Developmental Origins of Health and Disease) concept, which studies how maternal nutrition can influence fetal development, increasing the risk of diseases such as obesity, diabetes and heart disease throughout the life of offspring. Obesity is often associated with cardiovascular disease and hyperleptinemia, with changes in contractility, cardiac function and arterial hypertension. Therefore, this study aimed to evaluate the effect of maternal consumption of a high-fat diet (HF) on cardiac leptin expression, proteins involved in its cellular signaling pathway, and oxidative stress in the hearts of male offspring at weaning and in adulthood. For this purpose, Wistar rats were fed a normal-fat diet (9% lipids, group C) or a high-fat diet (29% lipids, HF group) for 7 weeks before mating, during gestation, and lactation. Half of the male offspring were euthanized in a CO<sub>2</sub> atmosphere at weaning (21 days), and the other half received a normal-fat diet *ad libitum* until 180 days of age, when they were euthanized with the aid of a guillotine. Body weight, visceral (retroperitoneal and epididymal) and subcutaneous (inguinal) white adipose tissue weight, heart weight, serum leptin concentration, cardiac hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) production, as well as protein expression of leptin signaling pathway components (ObR, JAK-2, STAT-3, STAT-3p and SOCS-3) were analyzed using Western blot and leptin mRNA expression was evaluated by q-PCR (process 017/2014 - CEUA-IB-UFRRJ). Maternal consumption of HF promoted, at 21 days, increased body weight, greater adiposity, hyperleptinemia and increased cardiac mass, suggesting cardiac hypertrophy. No difference in cardiac expression of ObR was observed between C and HF offspring. At 180 days, the HF offspring showed increased body weight, greater adiposity and hyperleptinemia, however, cardiac mass did not differ from that of the C offspring. We observed an increase in the protein expression of ObR, JAK-2, STAT3, STAT-3p and a reduction in the protein expression of SOCS-3. No increase in cardiac leptin mRNA expression was observed. In addition, we observed an increase in cardiac H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in adult HF offspring, suggesting an increase in oxidative stress. These results suggest that maternal HF consumption promotes obesity and hyperleptinemia in the neonatal and adult phases of male offspring rats. Overexposure of cardiac tissue to this hormone may promote cardiovascular diseases in the long term. In addition, the increase in the leptin pathway and oxidative stress in the heart of adult offspring may compromise cardiac function. Thus, the results demonstrate that the high-fat diet of the mothers during pregnancy and lactation can promote metabolic and cardiovascular dysfunctions in the neonatal and adult phases of the offspring.

**KEYWORDS:** metabolic programming, obesity, hyperleptinemia.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição da dieta hiperlipídica purificada 5400 cal/Kg (Prag Soluções®).....	33
Tabela 2. Condições experimentais padronizadas para cada anticorpo.....	36
Tabela 3. Condições da reação de PCR em tempo real para os iniciadores específicos.....	38
Tabela 4. Iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real.....	38
Tabela 5. Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade.....	43
Tabela 6. Peso relativo do tecido adiposo epididimal dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade.....	43
Tabela 7. Peso relativo do tecido adiposo inguinal dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade.....	44
Tabela 8. Peso do coração (mg) corrigida pelo comprimento da tíbia (cm) e peso dos ventrículos das proles C e DH aos 21 dias.....	45
Tabela 9. Concentração sérica de leptina da prole C e DH aos 21 dias de idade.....	45
Tabela 10. Peso do coração (g) corrigida pelo comprimento da tíbia (cm) e peso dos ventrículos das proles C e DH aos 180 dias de idade.....	49
Tabela 11. Concentração sérica de leptina da prole C e DH aos 180 dias de idade.....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Prevalência mundial da obesidade. Prevalência de obesidade (IMC  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) varia entre países selecionados (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), 2017; porcentagem de adultos com obesidade a partir de dados medidos). Em 2015, em todos os países da OCDE, a prevalência média de obesidade em adultos foi de 19,5% (linha pontilhada) e variou de < 6% no Japão a > 30% nos Estados Unidos. Fonte: Blüher (2019).....06

Figura 2. Prevalência de excesso de peso e de obesidade na população adulta de 20 anos ou mais de idade, por sexo - Brasil - 2002-2003/2019. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003/2008-2009, Pesquisa Nacional de Saúde 2013 e Pesquisa Nacional de Saúde 2019. Fonte: IBGE (2020).....07

Figura 3. (A) Representação gráfica de diferentes tipos de tecido adiposo: branco, bege e marrom. Fonte: adaptado de Puche-Juarez et al. (2023). (B) Cortes histológicos representativos de tecido adiposo branco, bege e marrom obtidos de camundongos, ampliação 100x, coloração hematoxilina e eosina (HE). Fonte: adaptado de Rodriguez et al. (2015). (C) Localização, função e expressão da UCP-1 dos tecidos adiposos branco, bege e marrom. Fonte: adaptado de Puche-Juarez et al. (2023); Sanchez-Gurmaches; Guertin (2014).....09

Figura 4. Esquema da sinalização intracelular da leptina no hipotálamo. ObRb: receptor de leptina isoforma longa; JAK-2: janus kinase-2; STAT3: transdutor de sinal e ativador de transcrição-3; SOCS-3: proteína supressora de sinalização de citocina-3; PI3K: fosfatidilinositol 3-kinase; IRS: substrato do receptor de insulina; PKB: fosfokinase B; PDE3B: fosfodiesterase 3B. Fonte: Adaptado de Sahu (2004).....12

Figura 5. Visão geral da geração e desintoxicação enzimática antioxidante de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS). Fonte: adaptado de Roberts; Sindhu (2009).....25

Figura 6. Representação esquemática da obtenção do modelo experimental. Ratas Wistar ( $\pm 60$  dias) divididas aleatoriamente em Grupo controle (C), que receberam dieta controle normolipídica e Grupo dieta hiperlipídica (DH), por 8 semanas antes do acasalamento e

durante toda a gestação e lactação das ninhadas. Fonte: Rangel (2022), adaptado de Franco e colaboradores (2012).....31

Figura 7. Representação esquemática da identificação das proles analisadas. As matrizes em dieta controle originaram a prole Controle (C) e as matrizes em dieta hiperlipídica originaram a prole Dieta Hiperlipídica (DH). Fonte: Rangel (2022), adaptado de Franco e colaboradores (2012).....32

Figura 8. Representação esquemática do acompanhamento das proles macho C e DH do desmame à idade adulta (180 dias). Ambas as proles receberam somente dieta controle normolipídica durante este período. Fonte: Rangel (2022).....33

Figura 9. Evolução do ganho de massa corporal (g) das matrizes dos grupos C (n=20) e DH (n=20) ao longo de 8 semanas antes do acasalamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste Two-Way ANOVA, seguido de pós-teste Sidak.....40

Figura 10. Ingestão alimentar (g/animal/dia) das matrizes dos grupos C (n=20) e DH (n=20) ao longo das 8 semanas anteriores ao acasalamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \* p<0,05. Teste Two-Way ANOVA, seguido de pós-teste de Sidak...41

Figura 11. Evolução da massa corporal dos filhotes machos das proles C (n=47) e DH (n=29), durante todo o período de lactação. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. \*p<0,05. Teste two-way ANOVA seguido de pós-teste Sidak.....42

Figura 12. Expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos machos das proles C (n=7) e DH (n=7). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t-Student.....46

Figura 13. Peso corporal dos animais machos da prole C e DH aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 9). \*p<0,05. Teste *t-Student*.....47

Figura 14. Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal das proles C e DH, aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 8). \*p<0,05. Teste *t-Student*.....48

Figura 15. Peso relativo do tecido adiposo inguinal das proles C e DH, aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 8). \*p<0,05. Teste *t-Student*.....48

Figura 16. Peso relativo do tecido adiposo epididimal das proles C e DH, aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 8). \*\*\*p<0,001. Teste *t-Student*.....49

Figura 17. Expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos machos das proles C (n=3) e DH (n=6). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*p<0,05. Teste *t-Student*.....50

Figura 18. Expressão proteica de JAK-2 na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica de JAK-2 na parede livre do VE dos machos das proles C (n=3) e DH (n=6). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*p<0,05. Teste *t-Student*.....51

Figura 19. Expressão proteica de STAT-3 na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B)

Análise densitométrica da expressão proteica de STAT-3 na parede livre do VE dos machos das proles C (n=5) e DH (n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média. \*p<0,05. Teste t-*Student*.....52

Figura 20. Expressão proteica de STAT-3p na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica de STAT-3p na parede livre do VE dos machos das proles C (n=5) e DH (n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média. Teste t-*Student*.....52

Figura 21. Expressão proteica de SOCS3 na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de Ciclofilina foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica de SOCS3 na parede livre do VE dos machos das proles C (n=3) e DH (n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média. \*p<0,05. Teste t-*Student*.....53

Figura 22. Expressão cardíaca do RNAm da leptina dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A expressão de 36 $\beta$ 4 foi usada como controle interno. Machos C (n = 3), machos DH (n =6). Dados expressos como média ± erro padrão da média. Teste t-*Student*.....54

Figura 23. Geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das proles C e DH aos 180 dias de vida. Machos C (n = 5), machos DH (n =6). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média, \*p=0,054. Teste t-*Student*.....54

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

ACh - acetilcolina  
ADMA - dimetilarginina assimétrica  
AGLs - ácidos graxos livres  
AgRP: peptídeo relacionado ao gene agouti  
Akt: proteína quinase serina/treonina  
APJ: receptor para apelina  
apo B - apolipoproteína B  
AT-1: receptor para angiotensina II isoforma 1  
ATP: trifosfato de adenosina  
CAF - dieta obesogênica do tipo "cafeteria"  
CART: transcrição regulada por cocaína e anfetamina  
CAT - catalase  
cDNA - DNA complementar  
CLA - ácido linoleico conjugado  
cm: centímetro  
COL1A1 - gene que codifica proteínas de colágeno do tipo I  
COL1A3 - gene que codifica proteínas de colágeno do tipo III  
db/db - receptor para leptina  
DCNTs - doenças crônicas não transmissíveis  
DCVs - doenças cardiovasculares  
DMH - hipotálamo dorsomedial  
DNA - ácido desoxirribonucleico  
DNMTs - enzimas metiltransferases  
DOHaD - do inglês Developmental Origins of Health and Disease  
ECA - enzima conversora de angiotensina  
eNOS - óxido nítrico sintase endotelial  
EROS - espécies reativas de oxigênio  
ET-1 - Endotelina-1  
GAPDH - proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase  
GPx - glutationa peroxidase  
GST - glutationa S-transferase  
H&E - Hematoxilina e eosina  
HATs - acetiltransferases  
HDACs - desacetilases  
HDL - do inglês high density lipoprotein  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IGF-1 - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1  
IL-6- interleucina-6  
IMC – índice de massa corporal  
JAK2 - Janus quinase 2  
kDa - kilo Dalton  
kg: kilograma  
LDL - do inglês low density lipoprotein  
MDA - malondialdeído  
MEC - matriz extracelular  
miRs - microRNAs  
MMP-2 - metaloproteinase-2

MMPs - metaloproteinases  
mTOR - do inglês mechanistic target of rapamycin  
NADPH oxidase - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogênio  
NF-κB - expressão do fator nuclear kappa B  
NF - do inglês normal-fed  
NO - óxido nítrico  
NOS - Óxido nítrico sintetasas  
NPY - neuropeptídeo Y  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - ânions superóxido  
ob/ob - gene leptina  
ObR - receptor para leptina  
ObRb - receptor para leptina isoforma longa b  
OCDE - Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico  
OF - do inglês overfeeding  
OMS - Organização Mundial da Saúde  
ONOO<sup>-</sup> - Oxidante peroxinitrito  
PA - pressão arterial  
PAR - do inglês predictive adaptative responses  
PAS - pressão arterial sistólica  
PCO - proteínas carboniladas  
PI3K - fosfatidilinositol 3-quinase  
PKC - proteína quinase C  
PNS - Pesquisa Nacional de Saúde  
POMC - pró-opiomelanocortina  
PON1 - paraoxonase 1  
RAA - renina angiotensina adosterona  
RIA - radioimunoensaio  
RNA - ácido ribonucleico  
RNAm - RNA mensageiro  
SM - síndrome metabólica  
SOCS3 - supressor da sinalização de citocinas, tipo 3  
SOD -superóxido dismutase  
MnSOD - superóxido dismutase de manganês  
AT3 - do inglês Signal Transducer and Activator of Transcription 3  
STAT3p - isoforma fosforilada STAT3  
TAB - Tecido adiposo branco  
TAM - Tecido adiposo marrom  
TGAs - triglicerídeos  
TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral  $\alpha$   
UCP-1 - Proteína desacopladora 1  
VEGF - fator de crescimento endotelial vascular  
VLDL - do inglês very low density lipoprotein

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>3</b>
2.1 Obesidade: Impactos na Saúde.....	3
2.2 Obesidade: Cenários Mundial e Brasileiro.....	6
2.3 Tecido Adiposo.....	7
2.4 Leptina: Mecanismos de Ação e Sua Relação Com Obesidade.....	11
2.4.1 Leptina e o sistema cardiovascular.....	14
2.5 Programação Metabólica e Conceito DOHaD.....	16
2.5.1 Programação metabólica e função cardíaca.....	23
2.6 Equilíbrio Redox.....	26
2.7 Justificativa.....	30
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo Geral.....	31
3.2 Objetivos Específicos.....	31
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>33</b>
4.1 Animais.....	33
4.2 Desenho Experimental.....	33
4.3 Avaliação da Hipertrofia Cardíaca.....	36
4.4. Dosagem de Leptina Sérica.....	36
4.5 Análise da Expressão de Proteínas da Via de Sinalização da Leptina (ObR, JAK2, STAT3, STAT3p e SOCS3).....	37
4.6 Quantificação da Expressão Gênica do RNAm da Leptina.....	38
4.6.1 Transcrição reversa.....	39
4.6.2 PCR em tempo real.....	39
4.7 Quantificação Cardíaca de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	41
4.8 Análise Estatística.....	41
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 Acompanhamento da Massa Corporal e Ingestão Alimentar das Matrizes Durante o Consumo das Dietas.....	42
5.2 Acompanhamento dos Animais Machos das Proles do Nascimento ao Desmame (21 Dias de Idade).....	43
5.2.1 Peso corporal dos filhotes do nascimento ao desmame.....	44
5.2.2 Avaliação do peso dos tecidos adiposos inguinal, retroperitoneal e epididimal, e do coração.....	45
5.2.3 Avaliação da leptina sérica.....	47
5.2.4 Avaliação do conteúdo proteico do receptor ObR no coração das proles.....	47
5.3 Acompanhamento da Prole Macho do Desmame à Idade Adulta (180 dias).....	48
5.3.1 Peso corporal da prole do desmame à idade adulta.....	48
5.3.2 Avaliação do peso dos tecidos adiposos inguinal, retroperitoneal e epididimal, e do	

coração.....	49
5.3.3 Avaliação da leptina sérica.....	51
5.3.4 Análise da via de sinalização da leptina: expressão cardíaca do receptor ObR, JAK-2, STAT-3, STAT-3p, SOCS-3.....	51
5.3.5 RNAm para leptina.....	55
5.3.6 Geração de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> nas proles C e DH adulta.....	56
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O consumo alimentar da sociedade moderna tem se baseado cada vez mais na ingestão de alimentos ultraprocessados e *fast foods*, ricos em açúcares, gorduras saturadas e sal. A falta de atividade física associada a uma dieta hipercalórica resulta no desequilíbrio entre consumo alimentar e gasto energético, fatores-chave que contribuem para a modificação na composição corporal da população. A combinação deste padrão alimentar com o sedentarismo tem sido associada ao aumento na prevalência de doenças crônicas, como obesidade, diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares (DCV) em adultos e crianças.

Nesta conjuntura, o desequilíbrio energético causado pela má alimentação oriunda de uma dieta rica em lipídios, tendo como consequência a elevação do índice de massa corporal (IMC), o excesso de ganho de peso antes e durante a gestação são reconhecidos como fatores cruciais que podem influenciar negativamente o desenvolvimento fetal, resultando em alterações permanentes na estrutura e no metabolismo do indivíduo ao longo da vida.

Estudos de epidemiologia clínica indicam que insultos ambientais, hormonais ou nutricionais que ocorram durante as fases iniciais do desenvolvimento intrauterino e neonatal, conhecidos como períodos críticos do desenvolvimento, podem acarretar no aumento do risco de doenças crônicas na vida adulta, sendo esta a definição de programação metabólica ou plasticidade ontogenética (particularmente por ocorrer durante o nosso desenvolvimento). Neste contexto, os hábitos alimentares maternos, especialmente durante a gestação e lactação, desempenham um papel central no estabelecimento do fenótipo da prole, contribuindo para a predisposição ao desenvolvimento de doenças metabólicas e cardiovasculares. Portanto, a investigação dos efeitos de uma dieta hiperlipídica ao longo da gestação e lactação na programação metabólica da prole em estágios posteriores da vida é de grande relevância.

A elaboração de modelos experimentais, em especial, com roedores, para estudar a programação metabólica nos auxiliam na identificação dos processos fisiopatológicos que ajudam na compreensão dos efeitos de condições adversas que acontecem, em particular, durante a gestação e amamentação, traduzindo as conclusões das pesquisas para a saúde humana. A forma mais similar de reproduzir, em laboratório, a obesidade da sociedade ocidental se dá pelo fornecimento de dietas específicas, visando o acúmulo de gordura da

espécie em estudo. As dietas mais comuns para essa finalidade são aquelas ricas em lipídios e/ou carboidratos.

Estudos com modelos experimentais sobre programação metabólica por dieta hiperlipídica durante os períodos da gestação e lactação demonstram efeitos em longo prazo na vida dos descendentes. Evidências de estudos em roedores, ovelhas e primatas não-humanos sugerem que as funções cardiovasculares e metabólicas da prole são comprometidas de forma persistente quando expostas à obesidade materna. Esta conjuntura tem como consequência maior risco de desenvolver distúrbios metabólicos, como a Síndrome Metabólica (SM), caracterizada pelo comprometimento no metabolismo glicídico, hipertensão arterial, dislipidemia, obesidade, hiperfagia e hiperleptinemia, por exemplo.

Estudos na literatura indicam uma relação entre a programação metabólica por dieta rica em lipídios ofertada às matrizes e o surgimento de hipertrofia cardíaca e redução no débito cardíaco na prole de ambos os sexos.

Diante desse cenário, a presente pesquisa propõe investigar os efeitos de dieta hiperlipídica em matrizes durante a gestação e lactação na programação metabólica da prole adulta de ratos. Este estudo foca, especialmente, nas repercussões na função cardíaca, com ênfase na relação entre a exposição excessiva do coração à leptina e os danos decorrentes dessa condição. Entender como este hormônio, que dentre outros papéis, está relacionado a processo inflamatório, pode comprometer o equilíbrio redox, a função dos cardiomiócitos e desencadear danos cardiovasculares é essencial para ampliar o conhecimento acerca dos mecanismos envolvidos na programação metabólica por dieta hiperlipídica e o sistema cardiovascular.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Obesidade: Impactos na Saúde

As doenças crônicas não transmissíveis (DCNTs), como as DCVs e diabetes do tipo 2, causam cerca de 74% dos falecimentos prematuros em todo o mundo, sendo a maior razão de morte e incapacidade precoce (OMS, 2022). A obesidade é reconhecida como um dos principais fatores de risco para essas enfermidades, pois contribui para alterações metabólicas e inflamatórias que favorecem seu desenvolvimento. O excesso de tecido adiposo, especialmente o visceral, está associado à resistência à insulina, dislipidemias, hipertensão arterial e inflamação sistêmica crônica, condições que, em conjunto, aumentam o risco de complicações cardiovasculares e metabólicas (Blüher, 2019; OMS, 2022). Além disso, a obesidade está relacionada a redução significativa na expectativa de vida, com perdas estimadas entre 5 e 20 anos, dependendo da gravidade da condição e da presença de comorbidades associadas (Blüher, 2019; OMS, 2022).

A obesidade é uma condição multifatorial caracterizada pelo acúmulo excessivo de tecido adiposo no organismo, decorrente de fatores como a hipertrofia e a hiperplasia dos adipócitos. A falta de atividade física, a adoção de uma dieta hipercalórica, o desequilíbrio entre consumo alimentar e gasto energético resultando no balanço energético positivo crônico, e a influência de predisposição genética são fatores-chave que contribuem para o seu desenvolvimento. O cálculo do IMC, que é uma medida internacional usada para avaliar a extensão da obesidade geral, resulta da divisão entre o peso (kg) da pessoa e o quadrado de sua altura ( $m^2$ ). Indivíduos adultos podem ser classificados como portadores de déficit de peso ( $IMC < 18,5 \text{ kg/m}^2$ ); de peso normal ( $IMC \geq 18,5 \text{ kg/m}^2 \text{ e } < 25 \text{ kg/m}^2$ ); de excesso de peso ( $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$ ); ou de obesidade ( $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) (Barroso *et al.*, 2017; Blüher, 2019; IBGE, 2020; Scheidl *et al.*, 2023).

A obesidade é um mecanismo fisiopatológico central no desenvolvimento da SM, que é um conjunto de fatores de risco para DCVs, abrangendo dislipidemias, hipertensão arterial, infarto do miocárdio e resistência à insulina (Blüher, 2019; Scheidl *et al.*, 2023). Também está relacionada a distúrbios musculoesqueléticos, como a osteoartrite. Além disso, pode contribuir para condições como Alzheimer, depressão, e várias formas de câncer, incluindo os de mama, ovário, próstata, fígado, rim e cólon. Ademais, a obesidade pode afetar a qualidade de vida, resultando em dificuldades laborais, redução da produtividade e problemas sociais adversos (Blüher, 2019).

No contexto da obesidade, a abdominal é considerada um dos principais fatores de risco para DCVs, uma vez que o excesso de gordura visceral está diretamente relacionado à resistência à insulina, dislipidemia, hipertrigliceridemia e inflamação. Esses fatores contribuem para a maior ocorrência de doenças metabólicas crônicas no mundo, cujos efeitos têm sido demonstrados através de estudos epidemiológicos e clínicos em diversas populações étnicas e demográficas (Barroso *et al.*, 2017; Costa; Valle, 2012; Fu *et al.*, 2015; Eickemberg *et al.*, 2020).

As dislipidemias em indivíduos obesos caracterizam-se, predominantemente, pelo aumento dos níveis plasmáticos de triglicerídeos (TAGs) e ácidos graxos livres (AGLs), acompanhados por redução das concentrações de lipoproteína de alta densidade (HDL - *high density lipoprotein*), bem como alterações estruturais e funcionais das proteínas que compõem o colesterol HDL. Ademais, observa-se concentração normal ou levemente elevada de lipoproteína de baixa densidade (LDL - *low density lipoprotein*), com aumento de partículas pequenas e densas, que possuem maior aterogenicidade (Trandafir *et al.*, 2022). A obesidade também está associada ao aumento da produção hepática de apolipoproteína B (apo B), elemento essencial na formação de lipoproteínas ricas em TAGs, como a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL - *very low density lipoprotein*). O acúmulo dessas lipoproteínas favorece o desenvolvimento da aterosclerose, contribuindo para a formação e instabilidade de placas ateromatosas em diferentes leitos vasculares (Trandafir *et al.*, 2022).

Paralelamente, a obesidade visceral está intrinsecamente relacionada à resistência insulínica, condição que compromete a captação de glicose pelos tecidos periféricos e resulta em hiperinsulinemia compensatória. Esse fenômeno desencadeia alterações metabólicas sistêmicas que podem culminar no desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 (Janus *et al.*, 2016). A hiperinsulinemia também exerce impacto direto na função endotelial, pois reduz a disponibilidade de óxido nítrico (NO), um importante vasodilatador, e favorece um ambiente de estresse oxidativo e inflamação crônica, aumentando o risco de complicações cardiovasculares. Além disso, a resistência insulínica no miocárdio altera a utilização de substratos energéticos, promovendo um metabolismo predominantemente lipídico e contribuindo para a lipotoxicidade, processo que compromete a homeostase celular e favorece a disfunção ventricular (Janus *et al.*, 2016; Hill *et al.*, 2021; Ormazabal *et al.*, 2018).

Outro impacto significativo da obesidade é sua associação com a hipertensão arterial. O acúmulo de tecido adiposo visceral tem sido identificado como fator determinante nesse

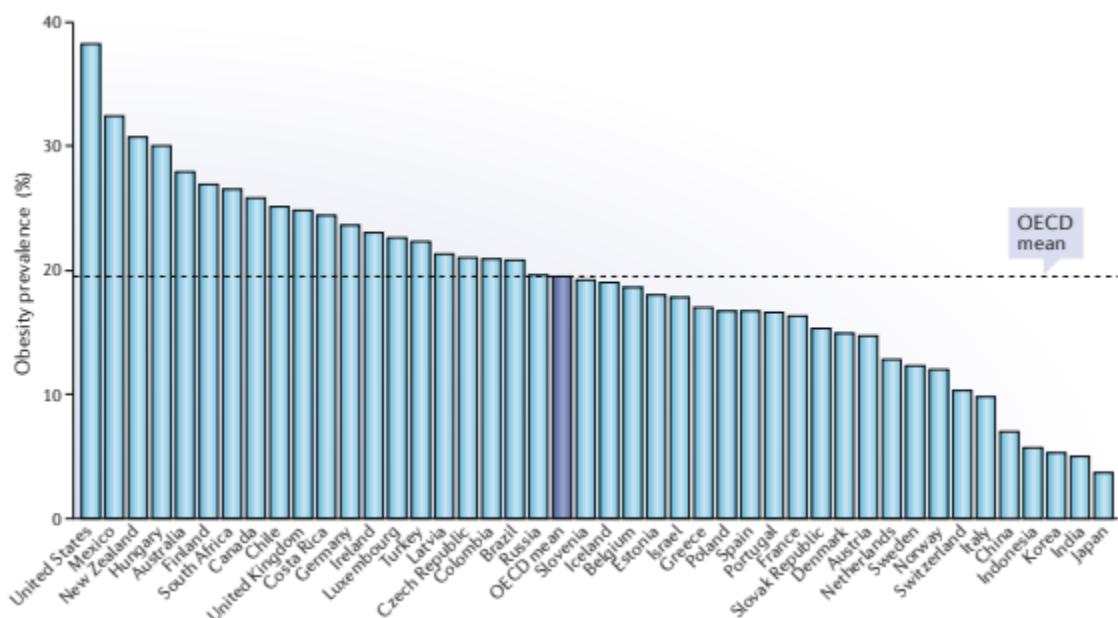
processo, uma vez que promove alterações hemodinâmicas e ativa componentes do sistema renina-angiotensina (Rubio-Ruiz *et al.*, 2014). A renina sintetizada pelos rins, promove a conversão do angiotensinogênio em angiotensina I, e, com a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), ocorre a formação de angiotensina II, um poderoso vasoconstritor. O receptor do tipo AT-1 para angiotensina II está presente nas células adiposas, e sua via de sinalização desempenha papel crucial na diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos (Rubio-Ruiz *et al.*, 2014). Entretanto, ao afetar a diferenciação de pré-adipócitos, a angiotensina II pode levar à adipócitos hipertrofiados e disfuncionais. Estes aumentam a produção de angiotensinogênio, leptina, espécies reativas de oxigênio (EROS) e citocinas pró-inflamatórias, o que sugere a perpetuação do ciclo de retroalimentação entre a obesidade e a hipertensão arterial (Hill *et al.*, 2021; Janus *et al.*, 2016; Ormazabal *et al.*, 2018; Rubio-Ruiz *et al.*, 2014).

A inflamação crônica observada na obesidade também desempenha papel central na patogênese das DCVs associadas. O aumento do tamanho dos adipócitos favorece a infiltração de macrófagos, e a liberação de AGLs pelas células adiposas promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) pelos macrófagos e a interleucina-6 (IL-6) pelos adipócitos. A presença da IL-6, em particular, tem sido implicada na disfunção endotelial e na fisiopatologia da hipertensão arterial, uma vez que contribui para o aumento do estresse oxidativo e reduz a biodisponibilidade do óxido nítrico (NO), importante vasodilatador para a manutenção da homeostasia cardiovascular (Ormazabal *et al.*, 2018; Rubio-Ruiz *et al.*, 2014; Trandafir *et al.*, 2022). Estudos realizados por Lee e colaboradores (2006) e Brands e colaboradores (2010) relataram que a hipertensão foi atenuada em camundongos *knockout* para IL-6.

A leptina, hormônio derivado do tecido adiposo e fundamental na regulação da homeostase energética, também sofre alterações na obesidade. Indivíduos obesos apresentam hiperleptinemia, entretanto, esse aumento na concentração circulante não resulta em redução da adiposidade possivelmente devido à resistência hipotalâmica à leptina. Diversos fatores têm sido considerados que influenciam na resistência à leptina, como dificuldades no transporte da leptina através da barreira hematoencefálica, diminuição das proteínas hipotalâmicas que atuam na retroalimentação negativa na via de sinalização da leptina, inflamação persistente, estresse oxidativo no retículo endoplasmático e processos de autofagia (Myers *et al.*, 2012; Jung; Kim, 2013; Ormazabal *et al.*, 2018).

## 2.2 Obesidade: Cenários Mundial e Brasileiro

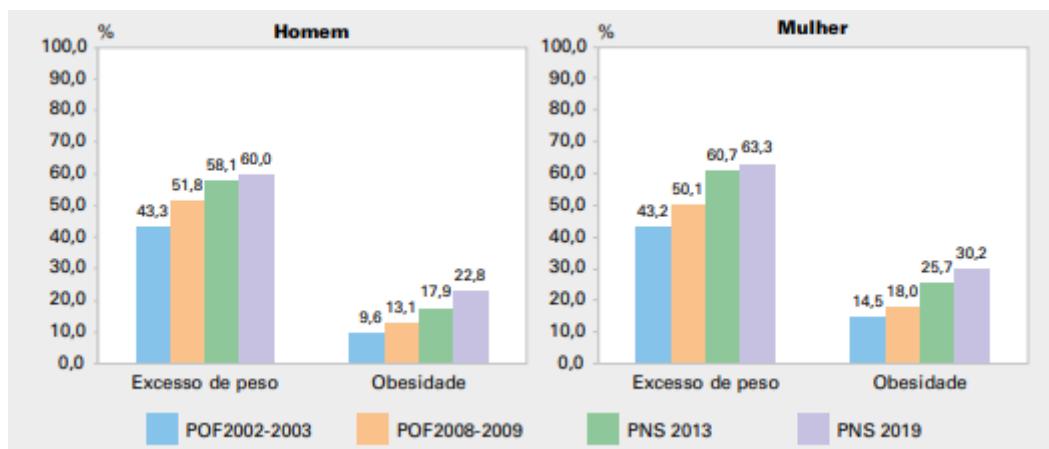
As taxas de obesidade aumentaram de forma global nos últimos 50 anos, esse incremento reflete uma complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais (Figura 1). Reconhecida como uma doença crônica pela OMS, a obesidade afeta milhares de indivíduos em todas as faixas etárias e classes sociais, sendo considerada um dos maiores desafios da saúde pública contemporânea (Barroso *et al.*, 2017; Blüher, 2019; OMS, 2022).



**Figura 1.** Prevalência mundial da obesidade. Prevalência de obesidade (IMC  $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ ) varia entre países selecionados (Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), 2017; porcentagem de adultos com obesidade a partir de dados medidos). Em 2015, em todos os países da OCDE, a prevalência média de obesidade em adultos foi de 19,5% (linha pontilhada) e variou de < 6% no Japão a > 30% nos Estados Unidos. Adaptado pelo autor com permissão da OCDE. Fonte: Blüher (2019).

Na conjuntura brasileira, conforme dados do segundo volume da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS) 2019, elaborado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em parceria com o Ministério da Saúde, a proporção de adultos com obesidade no país aumentou mais do que o dobro ao longo de 17 anos, subindo de 12,2% entre 2002 e 2003 para 26,8% em 2019. Durante esse mesmo intervalo, a fração de adultos com sobrepeso cresceu de 43,3% para 61,7%, correspondendo a quase dois terços da população brasileira (IBGE, 2020).

Conforme o avanço dos grupos de idade, a prevalência dessa condição tende a crescer, mas observou-se queda nos indivíduos com 60 anos de idade ou mais. Essa tendência se aplica a ambos os gêneros. Foi observado que as mulheres apresentam maior prevalência de excesso de peso comparadas aos homens, exceto no intervalo etário de 25 a 39 anos, onde a porcentagem é maior entre os homens. Em 2019, a taxa de obesidade era de 30,2% entre as mulheres e 22,8% entre os homens, enquanto o sobrepeso afetava 63,3% das mulheres e 60% dos homens, conforme Figura 2 (IBGE, 2020).



**Figura 2.** Prevalência de excesso de peso e de obesidade na população adulta de 20 anos ou mais de idade, por sexo - Brasil - 2002-2003/2019. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2002-2003/2008-2009, Pesquisa Nacional de Saúde 2013 e Pesquisa Nacional de Saúde 2019. Fonte: IBGE (2020).

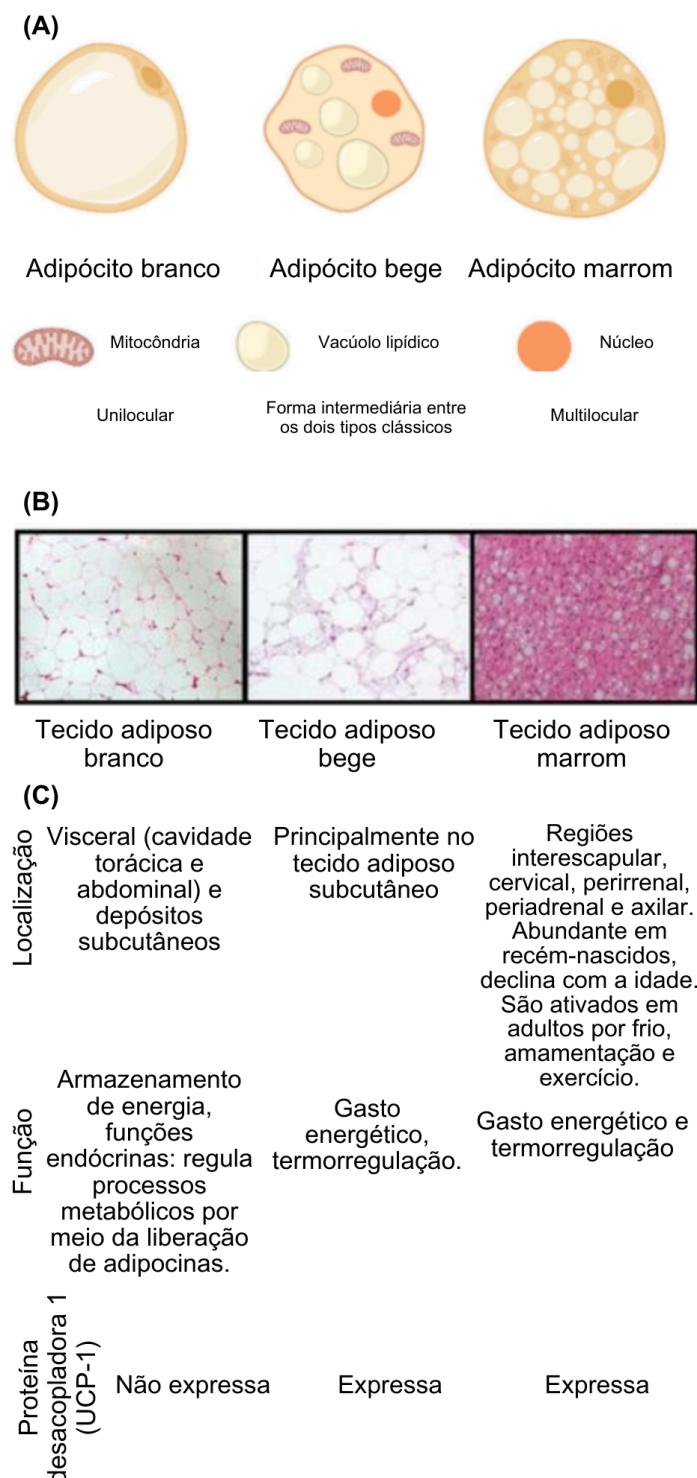
### 2.3 Tecido Adiposo

Conforme a Associação Americana de Endocrinologia, a obesidade é considerada uma condição patológica, descrita como uma “doença baseada na adiposidade” (Upadhyay *et al.*, 2018).

O tecido adiposo atua como um órgão endócrino ativo (produz adipocinas, como a leptina e a adiponectina) e possui papel imunológico. É composto por adipócitos maduros, tecido conjuntivo fibroso, colágeno, células nervosas, vasos sanguíneos, células mesenquimatosas, fibroblastos, pré-adipócitos, células precursoras endoteliais, células musculares lisas, elementos vasculares e macrófagos. As funções fisiológicas primordiais incluem o controle da ingestão alimentar, a gestão do peso corporal, assim como é local de reserva energética, sob a forma de TGAs, sendo liberados à medida que o organismo necessita, sustenta e protege diversos órgãos, funciona como isolante térmico, além de atuar

em processos inflamatórios, na coagulação, na sensibilidade à insulina e na função vascular (Scheidl *et al.*, 2023; Trandafir *et al.*, 2022; Upadhyay *et al.*, 2018).

Tradicionalmente os adipócitos têm sido classificados em dois tipos, diferenciando-se de acordo com sua estrutura, localização e função: o tecido adiposo branco (TAB), também denominado como comum, unilocular ou amarelo; e o tecido adiposo marrom (TAM), podendo ser nominado como multilocular ou pardo. No entanto, pesquisas recentes apontaram para uma terceira categoria denominada de adipócito bege ou tecido adiposo bege (Chu; Tao, 2017; Enerbäck, 2013; Puche-Juarez *et al.*, 2023; Rosen; Spiegelman, 2014) (Figura 3).



**Figura 3.** (A) Representação gráfica de diferentes tipos de tecido adiposo: branco, bege e marrom. Fonte: adaptado de Puche-Juarez *et al.* (2023). (B) Cortes histológicos representativos de tecido adiposo branco, bege e marrom obtidos de camundongos, ampliação 100x, coloração hematoxilina e eosina (HE). Fonte: adaptado de Rodriguez *et al.* (2015). (C) Localização, função e expressão da UCP-1 dos tecidos adiposos branco, bege e marrom. Fonte: adaptado de Puche-Juarez *et al.* (2023); Sanchez-Gurmaches; Guertin (2014).

A formação do tecido adiposo no organismo humano inicia-se entre a 14<sup>a</sup> e a 24<sup>a</sup> semana de gestação, com os depósitos adiposos já bem estabelecidos no início do terceiro trimestre. Em modelos animais, como ratos, o desenvolvimento do tecido adiposo ocorre durante a gestação e a lactação, sendo influenciado por sinais hormonais, nutricionais e epigenéticos das progenitoras, que podem programar modificações permanentes na composição e funcionalidade do tecido adiposo da prole. Esse processo de programação metabólica precoce tem sido amplamente estudado devido às suas implicações na susceptibilidade ao desenvolvimento de obesidade e doenças metabólicas ao longo da vida (Chu; Tao, 2017; Enerbäck, 2013; Puche-Juarez *et al.*, 2023; Rosen; Spiegelman, 2014; Sanchez-Gurmaches; Guertin, 2014; Scheidl *et al.*, 2023).

## 2.4 Leptina: Mecanismos de Ação e Sua Relação Com Obesidade

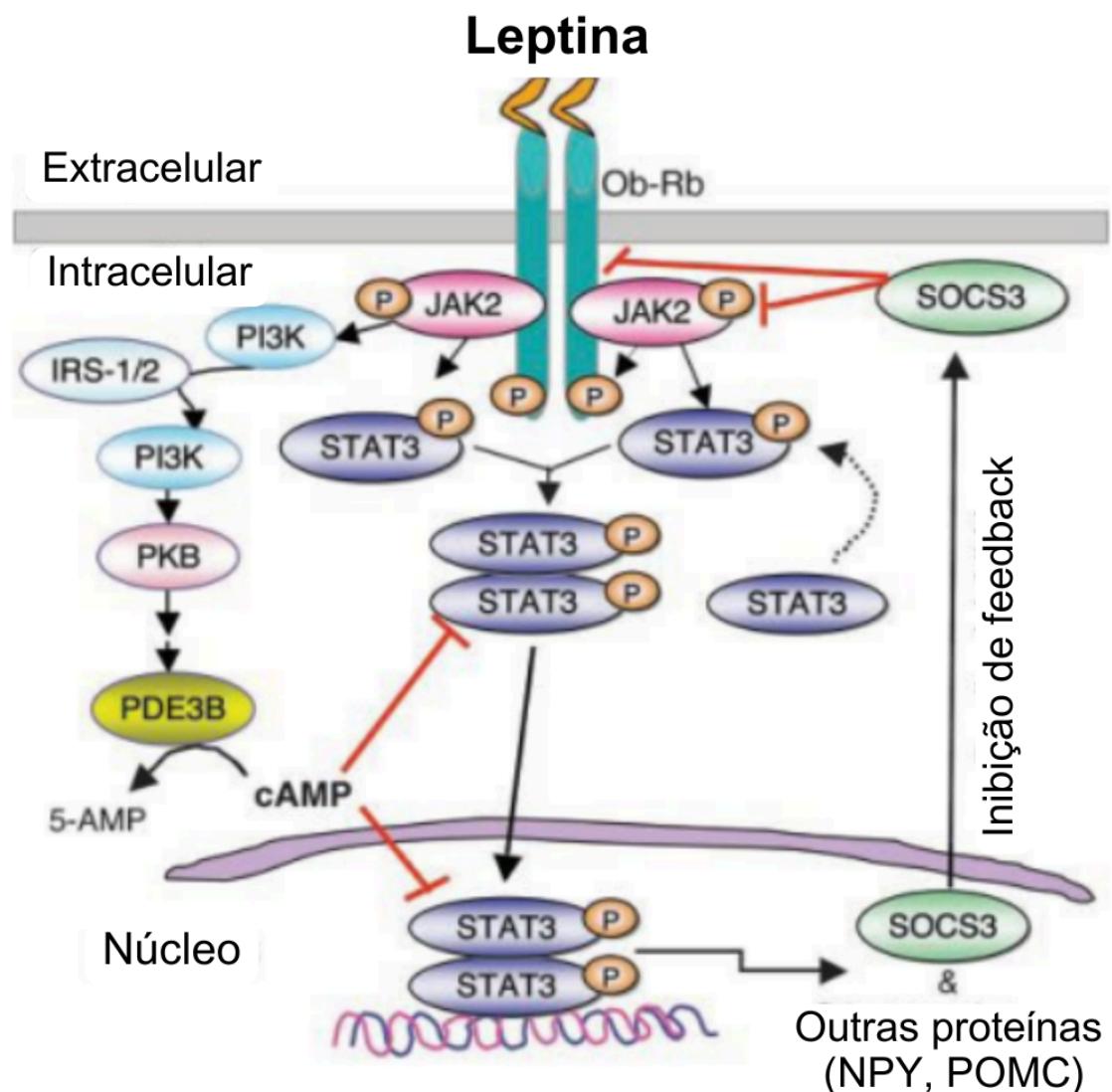
O tecido adiposo, outrora considerado apenas um reservatório de energia na forma de TGAs, é hoje reconhecido como um órgão endócrino ativo e multifuncional, capaz de modular diversas funções fisiológicas por meio da secreção de adipocinas, desempenhando papel crucial na regulação metabólica. As adipocinas, incluindo peptídeos, hormônios e outras moléculas, atuam de maneira autócrina, parácrina e endócrina, sinalizando o estado funcional do tecido adiposo para células-alvo no cérebro, fígado, pâncreas, vasos sanguíneos, músculos e outros tecidos. Elas estão envolvidas na regulação de processos como apetite, metabolismo e função imunológica inata. A secreção anormal dessas substâncias contribui para diversas doenças associadas à obesidade (Fasshauer; Blüher, 2015; Ghaben; Scherer, 2019; Puche-Juarez *et al.*, 2023). Dentre elas, a leptina e a adiponectina se destacam por seu papel na regulação do metabolismo energético e no desenvolvimento de DCVs (Zhao; Kusminski; Scherer, 2021). Estudos recentes reforçam a importância dessas moléculas na programação metabólica, evidenciando que alterações em seus níveis durante o período gestacional podem predispor a prole a distúrbios metabólicos ao longo da vida (Puche-Juarez *et al.*, 2023; Lisboa, 2023).

A leptina é um hormônio peptídico de 16 kDa produzido e secretado principalmente pelo TAB, foi descoberta em 1994 e revolucionou a compreensão do controle da homeostase energética (Puche-Juarez *et al.*, 2023; Zhao; Kuminski; Scherer, 2021). Originalmente identificada por seu papel clássico na regulação na inibição do apetite e na estimulação no metabolismo do gasto energético por meio de sua ação no hipotálamo (Fasshauer; Blüher,

2015). Pesquisas subsequentes revelaram suas funções pleiotrópicas, incluindo efeitos sobre a programação metabólica fetal, processos inflamatórios e DCVs (Zhao; Kusminski; Scherer, 2021).

O mecanismo de ação da leptina ocorre através da ligação aos seus receptores ObR (uma proteína da superfície celular pertencente à família dos receptores de citocinas) em vias hipotalâmicas, onde inibe a expressão de neuropeptídeos orexígenos, como o neuropeptídeo Y (NPY), peptídeo relacionado ao gene agouti (AgRP); e estimula a secreção de neuropeptídeos anorexígenos, como a pró-opiomelanocortina (POMC), transcrito regulado por cocaína e anfetamina (CART), (Crujeiras *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2011). Desta forma, a leptina promove diminuição na ingestão de alimentos e aumento no gasto energético, desempenhando papel crucial na manutenção da homeostase energética (Lima; Curi, 2012). No entanto, em condições de obesidade, há um aumento persistente nos níveis séricos de leptina, caracterizando um estado de resistência à leptina, que compromete sua função anorexigênica e favorece a manutenção do ganho de peso (Ghaben; Scherer, 2019). Existem várias isoformas do receptor ObR (a, b, c, d, e, f), sendo a isoforma longa ObRb a principal responsável pela transdução de sinal, uma vez que é amplamente expressa em regiões hipotalâmicas ligadas ao balanço energético, como o núcleo arqueado e os núcleos ventromedial e dorsomedial (Xu; Elmquist; Fukuda, 2011).

Ao se conectar a seu receptor ObR, a leptina ativa a via JAK-STAT, sua principal via de sinalização. A ligação com o ObR resulta na fosforilação e ativação de Janus quinase 2 (JAK2), que por sua vez fosforila outras enzimas ou proteínas. A JAK2 ativada promove a fosforilação do resíduo de tirosina do receptor, que serve de ‘âncora’ para a proteína STAT3, que sofre fosforilação. A isoforma STAT3p se dimeriza e é translocada ao núcleo, onde se liga à região promotora regulando a expressão de diversos genes, incluindo a SOCS3, proteína que realiza o feedback negativo da via, ao inibir a fosforilação de JAK2 e do resíduo de tirosina do receptor ObR, Figura 4 (Sahu, 2004).



**Figura 4.** Esquema da sinalização intracelular da leptina no hipotálamo. ObRb: receptor de leptina isoforma longa; JAK-2: janus kinase-2; STAT3: transdutor de sinal e ativador de transcrição-3; SOCS-3: proteína supressora de sinalização de citocina-3; PI3K: fosfatidilinositol 3-kinase; IRS: substrato do receptor de insulina; PKB: fosfokinase B; PDE3B: fosfodiesterase 3B. Fonte: adaptado de Sahu (2004).

#### 2.4.1 Leptina e o sistema cardiovascular

Além de sua função clássica no controle do apetite, há indícios de que a leptina exerce efeitos diretos em proteínas associadas ao sistema cardiovascular. Foi demonstrado que o coração é capaz de produzir leptina e expressa pelo menos três isoformas do ObR, incluindo o ObRa, ObRb e ObRe, sugerindo que a leptina possa agir de forma parácrina e autócrina nos cardiomiócitos (Purdham *et al.*, 2004). A ampla distribuição de receptores para leptina (ObR) em células vasculares e cardiomiócitos sugere que este hormônio module diretamente a fisiologia cardiovascular.

Zhao; Kuminski; Scherer (2021), através de uma revisão de estudos com modelos animais, em ratos e camundongos, realizaram uma compilação de evidências sobre a sinalização da leptina e seus efeitos na função cardíaca, incluindo ativação de vias intracelulares que modulam a contração e a frequência cardíaca. Estes estudos demonstram que a alta concentração sanguínea de leptina (hiperleptinemia) promove a ativação do sistema nervoso simpático, cuja ação no coração promove a fosforilação de proteínas que aumentam a força de contração, a velocidade de relaxamento e a frequência cardíaca.

No estudo conduzido por Simonds em colaboradores (2014), foi investigada a relação entre os níveis elevados de leptina, comuns na obesidade, e o aumento da pressão arterial (PA). Foi usado camundongos machos adultos C57Bl/6J, divididos em grupo controle e o grupo que induziu obesidade por meio de dieta hiperlipídica (43% de gordura) ao longo de 20 semanas. Durante esse período, observaram aumento progressivo no peso corporal, nos níveis plasmáticos de leptina, na frequência cardíaca e na PA (medida por radiotelemetria *in vivo*). Após 20 semanas, o grupo alimentado com dieta hiperlipídica recebeu dieta normolipídica por 4 semanas. Para avaliar o papel específico da leptina, foram utilizados camundongos machos, com quatro semanas de idade, geneticamente modificados, deficientes em leptina (ob/ob) ou em seu receptor (db/db), divididos em grupo controle e grupo com dieta hiperlipídica, por 20 semanas. Mesmo com obesidade severa, os animais *knockout* para leptina ou seu receptor, não apresentaram elevações na PA, sugerindo que a leptina é essencial para o aumento da PA associado à obesidade. Ao bloquear a ação da leptina no hipotálamo dorsomedial (DMH) por meio de anticorpos específicos ou antagonistas, houve redução rápida na PA dos camundongos obesos, independentemente de alterações no peso corporal. A reexpressão dos receptores de leptina no DMH de camundongos deficientes resultou em aumento da PA, reforçando o papel central dessa região cerebral na mediação dos efeitos da leptina sobre a PA. Em paralelo, foram avaliados humanos com mutações de perda de função

na leptina ou em seu receptor. Apesar da obesidade grave, esses indivíduos apresentaram PA mais baixa em comparação com controles obesos da mesma idade, indicando que a sinalização da leptina é crucial para a regulação da PA em mamíferos.

Habbout e colaboradores (2013), investigaram os impactos da superalimentação pós-natal na expressão gênica dos cardiomiócitos e nos parâmetros cardiometabólicos ao longo do tempo. Para isso, utilizaram camundongos C57BL/6 divididos em dois grupos: alimentado normalmente com ninhadas de 10 filhotes (NF: *normal-fed*) e outro submetido à superalimentação com redução da ninhada para 3 filhotes (OF: *overfeeding*). Após o desmame, todos receberam dieta padrão. O perfil de expressão gênica foi determinado no desmame e o metabolismo cardíaco e o estresse oxidativo foram avaliados aos 7 meses. Os resultados mostraram que, já no período juvenil, os camundongos OF apresentavam alterações na expressão gênica, incluindo modificações em genes associados à matriz extracelular (MEC). Na fase adulta, os animais submetidos à superalimentação exibiram aumento de 30% no peso corporal, além de elevações significativas nos níveis plasmáticos de colesterol, insulina e leptina. Também foi constatado maior estresse oxidativo no miocárdio, evidenciado pelo aumento da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Os camundongos OF apresentaram PA diastólica e sistólica significativamente elevadas, acompanhadas por redução na fração de ejeção e no encurtamento do ventrículo esquerdo. Além disso, em experimentos *ex vivo*, após 30 minutos de isquemia, os corações desses animais demonstraram recuperação funcional reduzida e maior tamanho de infarto em comparação ao grupo controle (31% vs. 54%). Também foi observada maior deposição de colágeno, além do aumento na expressão e atividade da metaloproteinase-2 (MMP-2) da MEC.

Estudos em modelos animais, em ratos, demonstraram que a hiperleptinemia das matrizes induzida por administração de leptina exógena, pode programar a prole adulta para obesidade, hiperleptinemia e resistência ao efeito anorexigênico da leptina (Pereira-Toste *et al.*, 2009). Por outro lado, quando administra-se leptina recombinante diretamente na prole durante os dez primeiros dias da lactação, os animais são programados para sobre peso e aumento do conteúdo de proteína corporal total, sem alteração de massa adiposa na idade adulta (Toste *et al.*, 2006a). Além disso, apresentam hiperleptinemia com resistência ao efeito anorexigênico da leptina, redução da expressão hipotalâmica de ObRb (Toste *et al.*, 2006b), hipertireoidismo (Toste *et al.*, 2006a), resistência à insulina, hiper corticosteronemia

(Fraga-Marques *et al.*, 2009), e aumento de catecolaminas adrenais (Trevenzoli *et al.*, 2007). Essas alterações foram ainda acompanhadas por maior PA e frequência cardíaca (Trevenzoli *et al.*, 2007). Em um estudo elaborado por Fukui e colaboradores (2017) demonstraram que a hiperleptinemia exacerba a fibrose atrial e a fibrilação atrial induzida por dieta hiperlipídica, sugerindo que a leptina pode desempenhar papel direto no remodelamento do miocárdio. Tais observações indicam que a obesidade das progenitoras, uma situação característica de hiperleptinemia, pode contribuir para o desenvolvimento ou programação de hipertensão e DCVs em ratos adultos (Fukui *et al.*, 2017).

## 2.5 Programação Metabólica e Conceito DOHaD

A Programação Metabólica e o conceito de Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD - *Developmental Origins of Health and Disease*), têm sido amplamente estudados nos últimos anos para a melhor compreensão de como eventos precoces na vida podem influenciar a saúde ao longo do desenvolvimento do indivíduo (Puche-Juarez *et al.*, 2023; Tain; Hsu, 2022).

Entre os anos 1960 e 1970, cientistas começaram a observar que, em várias espécies de mamíferos, como ratos, camundongos, porquinhos-da-índia e suínos, a diminuição na ingestão calórica ou na oferta de proteínas para as fêmeas durante a gestação e lactação impactava no crescimento e nas habilidades cognitivas da prole em distintos experimentos. Essa percepção foi a base para a teoria que relaciona o desenvolvimento à saúde e à doença, postulada inicialmente pelo epidemiologista britânico David Barker a partir da década de 1980. Segundo o pesquisador, as experiências vividas durante a fase fetal e a infância estão ligadas às origens de doenças crônico-degenerativas na idade adulta (Puche-Juarez *et al.*, 2023; Scheidl *et al.*, 2023).

A definição de programação sugere que fatores ambientais, nutricionais ou hormonais ocorridos durante as fases intrauterina e neonatal, que são momentos decisivos, e por isso são conhecidos como período crítico do desenvolvimento, podem resultar em efeitos imediatos ou duradouros na saúde do indivíduo na vida adulta, conceito conhecido como programação metabólica ou plasticidade do desenvolvimento (Puche-Juarez *et al.*, 2023; Tain; Hsu, 2022). Assim, um feto em um ambiente uterino desfavorável, como desnutrição ou excesso de nutrientes, infecções ou distúrbios químicos, metabólicos ou hormonais, responderia com adaptações (denominadas PAR - *predictive adaptative responses*), que são essenciais para a sobrevivência do feto nas condições presentes e para o futuro (Gluckman; Hanson; Buklijas, 2010; Lisboa, 2023; Mandy; Nyirenda, 2018).

Segundo Baker e seus colaboradores, humanos e os demais seres vivos contam com genes “poupadores” e genes desperdiçadores de energia, os quais são ativados ou desativados conforme as condições nutricionais e ambientais nos primeiros mil dias de vida. Esse fenômeno não causa mutações em nosso material genético, mas permite ou não que esses genes possam ser utilizados para a síntese de determinadas proteínas, resultando, após várias etapas, em efeitos fisiológicos (Gluckman; Hanson; Buklijas, 2010; Lisboa, 2023; Mandy; Nyirenda, 2018).

A placenta atua como sensor de nutrientes, regulando a transferência de nutrientes da progenitora para o feto e ajustando para atender às necessidades de crescimento fetal. Além disso, é um órgão endócrino transitório, secretando hormônios e citocinas que influenciam no metabolismo de ambos, matrizes e prole. Quando o suprimento de nutrientes e a capacidade de oxigenação da placenta são comprometidos, funções como o transporte de nutrientes e o crescimento placentário podem ser inibidas, resultando em crescimento fetal reduzido. Concentrações maternas de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1), leptina e insulina estão relacionadas ao crescimento fetal, sendo menores na restrição do crescimento fetal e maiores no supercrescimento fetal, ao contrário da adiponectina, que é aumentada na restrição de crescimento intrauterino e diminuída no supercrescimento (Napso *et al.*, 2022; Puche-Juarez *et al.*, 2023).

A epigenética tem demonstrado que os genes não são os únicos responsáveis pela transmissão de características biológicas entre gerações. Inicialmente, o Projeto Genoma foi recebido com grande expectativa, pois acreditava-se que o mapeamento do DNA permitiria tratar todas as doenças genéticas. No entanto, verificou-se que variações não genéticas adquiridas ao longo da vida também podem ser herdadas, levando à emergência da epigenética como um campo essencial para compreender alterações fenotípicas herdadas sem modificação na sequência do DNA (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019; Tain; Hsu, 2022).

Fatores ambientais, alimentação, exposição a poluentes e até interações sociais influenciam processos epigenéticos. Evidências mostram que mães subnutridas podem gerar filhos predispostos ao diabetes, assim como a exposição gestacional ao tabaco está relacionada ao aumento da obesidade em descendentes. Essa interação complexa entre genes e ambiente tem revolucionado os conceitos de hereditariedade, impulsionando novas abordagens na biologia e medicina (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019; Tain; Hsu, 2022).

O termo epigenética origina-se da epigênese e foi introduzido na biologia moderna pelo embriologista e geneticista Conrad Waddington em 1940 para descrever as interações

gene-ambiente que moldam o fenótipo. Atualmente, refere-se às modificações hereditárias que regulam a expressão gênica sem alterar a sequência do DNA (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019). O epigenoma compreende um conjunto de modificações químicas na cromatina e no genoma, determinando a expressão gênica e, consequentemente, o funcionamento celular. A finalidade deste código epigenético é fornecer diretrizes ao genoma sobre quando e onde os genes precisam ser ativados ou reprimidos. Esses processos exercem funções essenciais na biologia das células, e a sua desregulação pode resultar no desenvolvimento de enfermidades, como a obesidade, diabetes e câncer. Três mecanismos principais estão envolvidos: metilação do DNA, modificação de histonas e expressão de RNAs não codificantes (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019; Tain; Hsu, 2022).

A metilação do DNA ocorre em uma citosina onde enzimas metiltransferases (DNMTs) adicionam grupos metil ao DNA, silenciando a transcrição de genes essenciais para a homeostase celular. Entretanto, estudos recentes indicam que esse efeito depende da localização genômica, podendo também aumentar a expressão gênica em alguns casos (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019; Tain; Hsu, 2022).

As histonas, por sua vez, organizam o DNA em nucleossomos e regulam a transcrição por meio de alterações conformacionais. A acetilação, catalisada por acetiltransferases (HATs) e removida por desacetilases (HDACs), é um dos principais mecanismos que controlam a acessibilidade da cromatina, permitindo ou inibindo a expressão gênica. A acetilação das histonas abre a estrutura da cromatina, facilitando a ligação da maquinaria responsável pela transcrição (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019; Tain; Hsu, 2022).

Os microRNAs (miRs), ou seja, pequenos RNAs não codificantes, atuam na regulação pós-transcricional, degradando ou inibindo a tradução do RNA mensageiro em proteína, controlando mais de 30% dos genes codificadores de proteínas. Esses pequenos RNAs desempenham papel essencial na manutenção da homeostase celular e no desenvolvimento de doenças (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019).

No que diz respeito aos modelos experimentais em animais abordando insultos nutricionais na lactação, um dos modelos mais frequentes para examinar a supernutrição na fase neonatal é o que consiste em diminuir o tamanho da ninhada após o parto. Ratos ou camundongos colocados em ninhadas reduzidas recebem quantidade maior de leite e, consequentemente, aumentam de peso (Li *et al.*, 2013; Schumacher *et al.*, 2021).

Li e colaboradores (2013), investigaram os efeitos da supernutrição durante a lactação sobre o metabolismo e a epigenética do hipotálamo de camundongos. Para isso, no primeiro

dia pós-natal (P1), os animais foram distribuídos em dois grupos: controle (C), com ninhadas padrão, e com ninhadas reduzidas (SL, do inglês *small litter*), modelo que promove a superalimentação. Os camundongos SL apresentaram aumento significativo do peso corporal e da adiposidade ao desmame aos 21 dias (P21), efeitos que se mantiveram até a idade adulta aos 180 dias (P180). Análises metabólicas indicaram que, na vida adulta, as fêmeas SL não apresentaram maior ingestão alimentar, mas exibiram redução na atividade física espontânea e no gasto energético. Entre os machos, observou-se declínio da atividade física com o avanço da idade em ambos os grupos. Estes achados sugerem que a programação metabólica induzida pela supernutrição pós-natal envolvia mecanismos além do balanço energético clássico.

Para investigar os potenciais mecanismos epigenéticos subjacentes a essas alterações, Li *et al.* (2013) realizaram também o perfil de metilação do DNA em escala genômica no hipotálamo dos camundongos, através de amplificação específica de metilação e hibridização de microarranjos (MSAM, do inglês *methylation-specific amplification and microarray hybridization*) durante o período de lactação até o desmame (em P0 e P21). Os resultados indicaram extensas mudanças na metilação do DNA hipotalâmico do grupo SL, sugerindo que esta fase representava um período crítico para modificações epigenéticas no cérebro, especialmente na regulação do metabolismo. Foram identificadas mudanças sutis, mas persistentes, na metilação do DNA no hipotálamo dos camundongos SL ao longo do desenvolvimento, com padrões distintos entre machos e fêmeas, tendo as fêmeas apresentado as modificações mais proeminentes. Além disso, análises do transcriptoma hipotalâmico na idade adulta evidenciaram alterações significativas na expressão de genes relacionados ao controle energético, de forma também sexo-específica. Os achados sugerem que a supernutrição durante a lactação, no período pós-natal precoce induz reprogramações epigenéticas duradouras no hipotálamo, especialmente em fêmeas, contribuindo para um fenótipo de menor atividade física e gasto energético, em especial em fêmeas adultas, características associadas a maior risco de doenças metabólicas na vida adulta.

Schumacher e colaboradores (2021), investigaram em modelo de ninhada reduzida (SL) em ratos machos, modificações na regulação de genes envolvidos na homeostase energética e sua relação com o desenvolvimento precoce da obesidade. No quarto dia pós-natal (PND4), as ninhadas foram ajustadas para dois grupos: controle, com 10 filhotes por fêmea (ninhadas normais), e um grupo experimental (SL), com a redução para 4 por progenitora, resultando em maior acesso ao leite materno e consequente suplementação

neonatal. Os efeitos foram avaliados no desmame aos 21 dias (PND21) e na fase adulta jovem aos 90 dias (PND90). No desmame os ratos SL apresentaram maior peso corporal e características compatíveis com SM, incluindo alterações na expressão de genes relacionados ao controle da ingestão alimentar no núcleo arqueado do hipotálamo, como aumento na expressão de POMC, CART, NPY e dos receptores de leptina e grelina (GHSR). Análises epigenéticas revelaram hipometilação no promotor do gene POMC, sugerindo que a superalimentação neonatal induz modificações epigenéticas que podem favorecer a hiperfagia e o desenvolvimento da obesidade. Embora, na fase adulta (PND90), os parâmetros metabólicos e a expressão gênica no hipotálamo tenham retornado a níveis semelhantes ao controle, o padrão de metilação do promotor do gene POMC permaneceu alterado, indicando a persistência de alterações epigenéticas. Esses achados reforçam o conceito de plasticidade do desenvolvimento, no qual exposições nutricionais precoces podem programar alterações epigenéticas duradouras em vias centrais envolvidas na regulação metabólica, contribuindo para a susceptibilidade a distúrbios metabólicos ao longo da vida.

A programação metabólica refere-se ao fenômeno pelo qual insultos ambientais, nutricionais ou hormonais durante períodos críticos do desenvolvimento, como o fetal e neonatal, impactam permanentemente a fisiologia do organismo, predispondo-o a doenças crônicas na vida adulta. Diferentes modelos experimentais têm sido utilizados para investigar esses efeitos, abrangendo desde estudos epidemiológicos até experimentações em animais, cada um contribuindo para o entendimento dos mecanismos subjacentes a essa condição (Mandy; Nyirenda, 2018; Habbout *et al.*, 2013).

Estudos epidemiológicos, clínicos e experimentais, têm demonstrado que insultos durante a gestação e lactação elevam o risco de desenvolvimento de DCNTs ao longo da vida, como obesidade, DCVs e diabetes. Entre os possíveis insultos, também denominados como fatores de *imprinting*, podem ser: relacionados à nutrição, como a falta ou excesso de nutrientes; hormonais, como o aumento de hormônios como o cortisol e a adrenalina em momentos de estresse, além de doenças endócrinas como o diabetes tipo 2; e ambientais, como a exposição a poluentes como nicotina (Mandy; Nyirenda, 2018; Chen; Kelly, 2005).

A exposição intrauterina ao excesso de nutrientes também foi associada a alterações epigenéticas que modulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo energético. As dietas obesogênicas são amplamente utilizadas em estudos de programação metabólica e podem ser classificadas em dietas hiperlipídicas, hiperglicídicas e dietas do tipo ocidental. A

dieta hiperlipídica consiste na administração de uma composição alimentar contendo entre 40% a 60% de calorias provenientes de lipídios, enquanto a dieta hiperglicídica contém suplementação de açúcar na ração ou na água fornecida aos animais (Habbout *et al.*, 2013). A dieta ocidental, por sua vez, combina ambas as características, sendo rica em ácidos graxos saturados e açúcares refinados. Um modelo específico dentro dessa categoria é a dieta de cafeteria, que oferece alimentos altamente palatáveis e ultraprocessados, induzindo o consumo calórico excessivo (aproximadamente 50% das calorias sob a forma de lipídeos) e mimetizando hábitos alimentares humanos contemporâneos (Habbout *et al.*, 2013).

Estudos experimentais, dentre eles com roedores, demonstram que a exposição de matrizes a dietas obesogênicas durante a gestação e/ou lactação resulta em alterações no metabolismo da prole, incluindo hiperinsulinemia, resistência à leptina, aumento da adiposidade e alterações epigenéticas em genes relacionados à homeostase energética, mesmo na ausência de alteração significativa do peso corporal ao nascimento (Samuelsson *et al.*, 2013b). Além disso, essas dietas promovem modificações na composição do leite das progenitoras, elevando os níveis de triglicerídeos, colesterol, ácidos graxos saturados, hormônios metabólicos, além de alterações no transcriptoma, contribuindo para o desenvolvimento de um fenótipo metabólico desfavorável na descendência (Bringhenti *et al.*, 2013; Samuelsson *et al.*, 2013b).

A lactação representa um período crítico para a programação metabólica, uma vez que a composição do leite materno pode ser significativamente alterada pela dieta materna. Modelos experimentais demonstram que a exposição a uma dieta hiperlipídica exclusivamente durante a lactação resulta em alterações metabólicas mais pronunciadas na prole quando comparada à exposição intrauterina isolada (Sun *et al.* 2012; Vithayathil *et al.*, 2018).

Sun e colaboradores (2012), investigaram os efeitos da dieta hiperlipídica (DH) materna na programação metabólica da prole de ratas *Sprague-Dawley*. Durante a gestação e lactação, as matrizes foram alimentadas com dieta padrão ou DH (60% das quilocalorias provenientes de gordura). No primeiro dia pós-natal (PND1), os filhotes foram realocados de forma cruzada, criando quatro grupos experimentais distintos: (1) filhotes expostos à dieta padrão durante a gestação e lactação, (2) filhotes expostos à DH apenas na gestação, (3) filhotes expostos à DH apenas na lactação, e (4) filhotes expostos à DH em ambos os períodos. O impacto da dieta foi avaliado por meio de medidas de peso corporal, composição corporal e tolerância à glicose tanto no desmame aos 21 dias quanto na idade adulta, e

sensibilidade à leptina, analisada via ativação do STAT3 no núcleo arqueado do hipotálamo, nos dias PND10 e PND21. Os resultados revelaram que os filhotes expostos à DH apenas durante a lactação apresentaram maior ganho de peso já no PND7, diferença essa que persistiu até o desmame, acompanhado de maior adiposidade, elevação da leptina plasmática e tolerância à glicose comprometida. A ativação de STAT3 em resposta à leptina foi reduzida, indicando um quadro de resistência precoce à leptina. Após o desmame, os machos criados por matrizes submetidas à DH desenvolveram hiperfagia e mantiveram o peso corporal superior ao dos filhotes expostos à dieta padrão. Tanto machos quanto fêmeas do grupo DH pós-natal apresentaram prejuízos na tolerância à glicose persistentes até a fase adulta. Dessa forma, o estudo demonstrou que a dieta DH materna exclusivamente durante a lactação teve maior influência na programação metabólica da prole do que na exposição intrauterina.

O estudo conduzido por Vithayathil *et al.* (2018), investigou os efeitos da exposição de progenitoras a uma dieta obesogênica do tipo "cafeteria" (CAF), rica em gordura e açúcar, durante a gestação e lactação sobre a composição corporal e a expressão de genes lipogênicos e de adipocina na prole de ratos *Wistar* de ambos os sexos. O objetivo foi determinar se a influência dessa dieta no período de amamentação teria impacto metabólico mais pronunciado na prole em comparação com a exposição intrauterina. Para isso, ratas prenhas foram alimentadas com dieta padrão (grupo Controle) ou dieta CAF durante a gestação e a lactação. Após o nascimento, os filhotes foram realocados para adoção cruzada, para mães do mesmo grupo alimentar ou para mães de um grupo alimentar diferente dentro das primeiras 24 horas de vida, permanecendo com as matrizes até o desmame aos 21 dias. Após esta fase foram separados das matrizes e alimentados somente com ração padrão até 42 dias de idade, permitindo a análise isolada dos efeitos da exposição pré-natal e pós-natal. O peso corporal, a composição de gordura corporal e a expressão de genes envolvidos no metabolismo lipídico foram avaliados no desmame e em três semanas após o desmame.

Os filhotes amamentados por matrizes CAF apresentaram menor peso corporal ao desmame, mas quase o dobro da porcentagem de gordura corporal em comparação com os filhotes de matrizes Controle, independentemente de terem nascido de uma progenitora Controle ou CAF. Aos 42 dias de vida, após a transição para a dieta padrão, os filhotes amamentados por fêmeas CAF permaneceram mais leves que os filhotes do grupo Controle, porém a diferença na composição de gordura corporal não foi mais significativa. A dieta CAF das matrizes durante a lactação promoveu na prole, ao desmame, aumento na expressão de adiponectina. Além disso, os níveis plasmáticos de leptina estavam duplicados ao desmame

em ambos os sexos na prole amamentada por matrizes CAF, mas diminuíram aos 42 dias, possivelmente em decorrência da transição para a dieta padrão.

A relação entre a programação metabólica e o desenvolvimento de obesidade e doenças metabólicas na prole também pode ser explicada por alterações neuroendócrinas. A exposição intrauterina e neonatal da prole a dietas obesogênicas das matrizes altera a sinalização de neuropeptídeos hipotalâmicos envolvidos no controle do apetite, como o aumento da expressão do NPY e a redução da POMC, favorecendo um comportamento alimentar hiperfágico na prole (Guberman *et al.*, 2013).

### **2.5.1 Programação metabólica e função cardíaca**

A programação metabólica desempenha um papel crucial no desenvolvimento da função cardíaca, influenciando diretamente a homeostase cardiovascular ao longo da vida. Evidências sugerem que alterações no ambiente intrauterino, como a exposição a dietas hiperlipídicas e hiperglicídicas durante a gestação e lactação, impactam o desenvolvimento estrutural e funcional do coração na prole. Essas alterações podem predispor ao desenvolvimento de DCVs na idade adulta, como hipertensão arterial, disfunção endotelial e insuficiência cardíaca (Scheidl *et al.*, 2023).

O estudo conduzido por Gray e colaboradores (2015), analisou como a exposição de matrizes a uma DH influencia a função endotelial e o estado cardiovascular da prole na vida adulta, bem como o potencial efeito modulador da suplementação materna com ácido linoleico conjugado (CLA). Ratas Sprague-Dawley prenhas foram divididas em quatro grupos: dieta controle purificada (CON), dieta CON com 1% de CLA, DH com 45% das calorias provenientes de gordura, e DH suplementada com 1% de CLA (DHCLA), sendo alimentadas durante toda a gestação e lactação. Após o desmame (dia 21), a prole recebeu dieta padrão até o final do experimento (dia 150), quando foram avaliados parâmetros cardiovasculares. A pressão arterial sistólica (PAS) foi medida nos dias 85 e 130, e, ao final do experimento, os vasos mesentéricos foram analisados quanto à resposta vasomotora. Os descendentes de fêmeas submetidas à DH apresentaram elevação da PAS nos dias 85 e 130 em comparação aos grupos CON e CLA, e que a suplementação materna com CLA não foi capaz de reverter esse efeito. Além disso, a prole do grupo DH exibiu uma resposta vasoconstritora reduzida à fenilefrina e uma resposta vasodilatadora atenuada à acetilcolina (ACh), sugerindo comprometimento na função endotelial. Também foi observada redução na função da via do óxido nítrico (NO), associada a um aumento compensatório da função

mediada pelo fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDDH) nos grupos DH e DHCLA. Esses achados indicam que a exposição a uma dieta DH durante a gestação e lactação pode programar a prole para desenvolver hipertensão e disfunção endotelial na vida adulta, independentemente do peso corporal. Embora a suplementação materna com CLA tenha demonstrado um efeito atenuador em alguns parâmetros da função endotelial, não foi suficiente para reverter completamente os danos causados pela DH das progenitoras.

Ahmed e colaboradores (2021), investigaram o impacto da obesidade materna durante a gestação na programação do desenvolvimento cardíaco da prole e sua relação com a suscetibilidade a doenças cardíacas na vida adulta. Camundongos fêmeas foram alimentadas com uma dieta obesogênica (33% de gordura e 30% de sacarose por kcal), antes e durante a gestação e, posteriormente, acasaladas com machos submetidos a uma dieta controle. A prole macho foi acompanhada desde o desenvolvimento embrionário, o desmame aos 21 dias, até a fase adulta para avaliar alterações funcionais no coração e perfis de expressão gênica em todo o genoma. Além disso, foram realizadas análises comparativas entre os corações de embriões de camundongos expostos à obesidade materna e corações fetais humanos provenientes de gestações de doadoras obesas.

Os resultados demonstraram que os descendentes adultos de progenitoras obesas apresentaram disfunção cardíaca leve, compatível com os estágios iniciais de cardiopatia. No nível molecular, foi observada no coração desses camundongos adultos a desregulação de genes envolvidos no remodelamento da MEC, metabolismo e sinalização do fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ), mecanismos reconhecidamente associados à progressão de doenças cardíacas. Essas mesmas vias já estavam desreguladas nos progenitores cardíacos de embriões de camundongos obesos. Além disso, em resposta ao estresse cardiovascular, os corações da prole adulta de matrizes obesas apresentaram remodelamento miocárdico exacerbado, com ativação excessiva de reguladores de interações célula-MEC e falha na ativação de reguladores metabólicos. Como consequência, os corações da prole tornam-se mais vulneráveis a respostas desreguladas ao estresse, aumentando a predisposição a doenças cardiovasculares ao longo da vida.

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa conduzidos no laboratório de investigação cardiometabólica investigaram os efeitos da programação metabólica em filhotes jovens, aos 30 dias de idade (Zeca, 2015) e adultos, aos 180 dias de idade (Rangel, 2022), de ratas *Wistar* submetidas a uma dieta hiperlipídica. As matrizes foram alimentadas com essa

dieta por oito semanas antes da concepção e durante toda a gestação e lactação, permitindo avaliar os impactos a longo prazo sobre a função cardíaca da prole (Zeca, 2015).

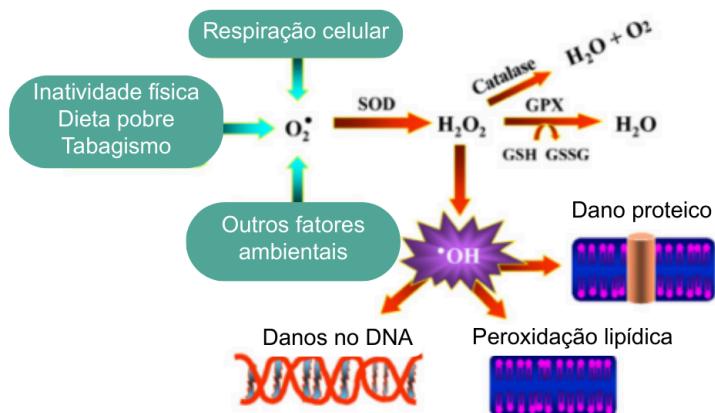
Na investigação conduzida por Zeca (2015), a avaliação da função cardíaca por ecocardiograma revelou que os filhotes machos da prole DH apresentaram aumento da área interna e da massa do ventrículo esquerdo, sem alterações na espessura do septo intraventricular e na dimensão da parede posterior do ventrículo esquerdo durante a sístole. Esses achados sugerem o desenvolvimento de hipertrofia ventricular excêntrica. A análise da função sistólica nos machos jovens indicou redução da fração de ejeção, sem alterações no percentual de encurtamento, no volume de ejeção ou no volume sistólico final. Esses resultados indicam que a diminuição da fração de ejeção não comprometeu a função sistólica, possivelmente devido à hipertrofia ventricular observada. Por outro lado, a prole fêmea não apresentou alterações na geometria do coração, mas exibiu redução da fração de ejeção, sem modificações no percentual de encurtamento e no volume de ejeção, além de um aumento no volume sistólico final, sugerindo comprometimento da função sistólica. Após o desmame, todos os filhotes passaram a consumir exclusivamente dieta normolipídica. Aos 30 dias de idade, não foram observadas diferenças significativas no peso corporal entre os grupos experimentais. Entretanto, a análise da função cardíaca revelou que, enquanto os filhotes machos compensavam a disfunção com hipertrofia ventricular, as fêmeas exibiam comprometimento sistólico mais evidente. Esses achados reforçam a influência da programação metabólica materna na predisposição à disfunção cardíaca da prole, mesmo na ausência de alterações dietéticas no período pós-natal.

O estudo experimental do nosso grupo de pesquisa conduzido por Rangel (2022) investigou se o consumo materno de dieta hiperlipídica promove alterações na função cardíaca da prole adulta e correlacionou esse fenótipo a modificações no sistema renina-angiotensina (SRA) e à sensibilidade do coração ao sistema simpato-adrenérgico. Os resultados demonstraram que tanto os machos quanto as fêmeas da prole DH apresentaram disfunção sistólica, evidenciada pela redução da fração de ejeção e do débito sistólico aos 180 dias de idade, sem que houvesse alterações significativas no peso corporal ou na adiposidade. No entanto, apenas os machos do grupo DH exibiram alterações estruturais no coração, bem como maior responsividade cardíaca ao estímulo adrenérgico. Além disso, a análise da expressão proteica revelou aumento na expressão do receptor AT2 nas fêmeas da prole DH, enquanto que nos machos a expressão desse receptor estava reduzida. Esses achados sugerem

que a maior expressão do receptor AT2 nas fêmeas pode ter um efeito protetor contra a disfunção cardíaca, enquanto a redução desse receptor nos machos pode estar associada ao processo de remodelamento cardíaco observado nesses animais. Dessa forma, o estudo reforça a hipótese de que a exposição intrauterina a uma dieta hiperlipídica pode ter consequências a longo prazo sobre a função cardíaca da prole, sendo os efeitos mediados por mecanismos distintos entre os sexos.

## 2.6 Equilíbrio Redox

O equilíbrio redox é um aspecto fundamental da homeostase celular, desempenhando papel essencial na regulação do metabolismo e na proteção contra danos oxidativos. Esse balanço é determinado pelo delicado controle entre a geração de EROS e a capacidade do organismo de neutralizá-las por meio de sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O estresse oxidativo ocorre quando esse equilíbrio é perturbado, resultando no acúmulo excessivo de EROS, que podem causar danos estruturais e funcionais a lipídeos, proteínas e modificações irreversíveis no DNA, comprometendo a integridade celular e desencadeando respostas inflamatórias e apoptóticas (Figura 5) (Noeman; Hamooda; Baalash, 2011; Roberts; Sindhu, 2009).



**Figura 5.** Visão geral da geração e desintoxicação enzimática antioxidante de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS). Oxigênio ( $O_2$ ), superóxido dismutase (SOD), água ( $H_2O$ ), grupo hidroxila ( $\cdot OH$ ), catalase, glutationa peroxidase (GPX), glutationa reduzida (GSH), glutationa oxidada (GSSG). Fonte: adaptado de Roberts; Sindhu (2009).

Estudos demonstram que o estresse oxidativo está fortemente associado a doenças metabólicas e inflamatórias, incluindo obesidade, diabetes tipo 2 e DCVs. A obesidade, em particular, contribui significativamente para o desequilíbrio redox, uma vez que a hiperglicemia, dislipidemia e a inflamação crônica promovem a geração excessiva de radicais livres e reduzem a eficiência dos sistemas antioxidantes endógenos (Noeman; Hamooda; Baalash, 2011; Tain; Hsu, 2022).

No coração a disfunção mitocondrial induzida pelo estresse oxidativo desempenha papel central na progressão das complicações metabólicas associadas à obesidade. O aumento do consumo de oxigênio, resultante da sobrecarga mecânica e da elevação do trabalho miocárdico, acelera o fluxo de elétrons na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, favorecendo a produção de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) e promovendo um ciclo vicioso de peroxidação lipídica (reação que degrada lipídios) e apoptose ou necrose celular, dependendo do estado energético da célula. Esse processo está associado a alterações estruturais no miocárdio, incluindo redução da contratilidade, fibrose e predisposição a arritmias cardíacas, podendo levar à insuficiência cardíaca e à morte súbita (Noeman; Hamooda; Baalash, 2011).

Noeman; Hamooda; Baalash (2011) demonstraram que ratos albinos brancos, machos e fêmeas, submetidos a uma dieta hiperlipídica por 16 semanas apresentaram aumento significativo no peso corporal e nos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol total e colesterol LDL, acompanhados por redução dos níveis de colesterol HDL. Além disso, a peroxidação lipídica, avaliada pelos níveis elevados de malondialdeído (MDA) e proteínas carboniladas (PCO), foi um dos principais marcadores do estresse oxidativo nos tecidos hepático, renal e miocárdico. Essa peroxidação compromete a função celular e agrava o processo inflamatório, contribuindo para a progressão de complicações metabólicas (Noeman; Hamooda; Baalash, 2011; Tain; Hsu, 2022). Em paralelo, os autores observaram significativa redução nas atividades das principais enzimas antioxidantes como a glutatona S-transferase (GST), glutatona peroxidase (GPx) e da enzima paraoxonase 1 (PON1), sem alteração na atividade da CAT nos tecidos hepático e miocárdico, mas com redução nos tecidos renais. Esses sistemas antioxidantes atuam na neutralização de radicais livres, prevenindo danos oxidativos em componentes celulares. A redução da atividade dessas enzimas pode ser atribuída à inativação direta por produtos da peroxidação lipídica, como MDA, além do consumo acelerado desses antioxidantes na tentativa de combater o estresse oxidativo exacerbado na obesidade. Esses achados reforçam a hipótese de que a obesidade é um fator de

risco para o aumento do estresse oxidativo, contribuindo para disfunções metabólicas e cardiovasculares associadas a essa condição (Noeman; Hamooda; Baalash, 2011).

Habbout e colaboradores (2013) demonstraram que camundongos da linhagem C57BL/6 submetidos a programação metabólica por superalimentação neonatal, apresentaram ao desmame (21 dias de idade), aumento na expressão de vários genes associados à estrutura da MEC cardíaca, bem como incremento na expressão cardíaca do RNA mensageiro para a apelina e na expressão da proteína do seu receptor, APJ. A apelina, uma adipocitocina com potente atividade inotrópica, também desempenha papel essencial na formação de cardiomiócitos e no desenvolvimento cardíaco. Aos sete meses de idade, a prole apresentou aumento significativo da adiposidade, hipercolesterolemia, hiperinsulinemia e hiperleptinemia. No tecido miocárdico, verificou-se aumento da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT, indicando a presença de estresse oxidativo. Esses animais também demonstraram redução da fração de ejeção e do percentual de encurtamento do ventrículo esquerdo, acompanhados por maior deposição de colágeno, possível resistência ventricular à leptina e hipertensão arterial (Habbout *et al.*, 2013).

O estresse oxidativo também emerge como um dos principais mecanismos envolvidos na fisiopatologia da programação fetal adversa induzida por dieta hiperlipídica materna. Durante o período gestacional, a produção excessiva de EROS pode sobrecarregar os sistemas antioxidantes do feto, levando à programação de desfechos patológicos, incluindo hipertensão arterial na vida adulta (Tain; Hsu, 2022). Em seu estudo de revisão, Tain e Hsu (2022) discutiram evidências atuais que ligam dieta rica em gordura das progenitoras à hipertensão na prole, fornecendo uma visão geral dos mecanismos potenciais subjacentes à hipertensão de origens desenvolvimentais. Em seu compilado relatam resultados do acompanhamento da prole de ratos, camundongos e coelhos, desde a infância até a idade adulta. Os autores indicaram que a dieta hiperlipídica das matrizes está associada ao aumento da peroxidação lipídica aos 90 dias de idade, dano oxidativo ao DNA e formação do agente oxidante peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), além da regulação positiva de enzimas produtoras de EROS. O acúmulo de estresse oxidativo nos vasos sanguíneos e nos rins da prole tem sido implicado diretamente na hipertensão induzida por dieta rica em lipídios das matrizes (Tain; Hsu, 2022).

Fernandez-Twinn e colaboradores (2012), investigaram os efeitos da dieta obesogênica de progenitoras (camundongos fêmeas) sobre o fenótipo cardíaco da prole e examinaram os mecanismos moleculares associados. Camundongos fêmeas foram

alimentadas com dieta obesogênica antes e durante a gestação e lactação, enquanto o grupo controle recebeu uma dieta normocalórica. Durante a gravidez e a amamentação, as matrizes submetidas à dieta obesogênica apresentaram ganho de peso e aumento do acúmulo de gordura em comparação com os controles. Após o desmame aos 21 dias, os filhotes foram mantidos sob dieta padrão até a oitava semana de vida, período no qual foram avaliadas alterações morfológicas e funcionais cardíacas, bem como biomarcadores de estresse oxidativo. A prole das matrizes expostas à dieta obesogênica apresentou aumento da massa cardíaca, com elevação nas razões entre o peso do coração-corpo e o peso do coração-comprimento da tíbia. Além disso, observou-se aumento da espessura da área da parede livre do ventrículo esquerdo e aumento da largura dos miócitos. Essas alterações estruturais foram acompanhadas por aumento na expressão de marcadores moleculares associados à hipertrofia cardíaca, sugerindo uma predisposição ao desenvolvimento de disfunção cardíaca na vida adulta.

No nível molecular, Fernandez-Twinn *et al.* (2012) observaram que a prole de matrizes alimentadas por dieta obesogênica apresentou hiperinsulinemia e ação aumentada da insulina por meio de proteína quinase serina/treonina (AKT) e alvo mecanicista da rapamicina (mTOR, do inglês *mechanistic target of rapamycin*), levando a uma ativação exacerbada de vias intracelulares associadas ao crescimento celular, cuja sinalização funciona na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, e regula a indução de hipertrofia cardíaca. Paralelamente, verificou-se aumento na fosforilação de uma proteína associada ao remodelamento patológico do miocárdio. Além disso, foi identificado um quadro de estresse oxidativo na prole exposta à dieta obesogênica das matrizes, evidenciado pelo aumento da expressão de um componente da NADPH oxidase (Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Hidrogênio), e pela redução dos níveis de superóxido dismutase de manganês (MnSOD), uma enzima antioxidante essencial para a defesa celular. Esse desequilíbrio redox foi corroborado pelo aumento dos níveis de marcador de peroxidação lipídica.

Os achados de Fernandez-Twinn e colaboradores (2012) indicam que a dieta obesogênica das progenitoras promove hipertrofia cardíaca associada ao estresse oxidativo e à ativação de vias de sinalização celular relacionadas ao crescimento e remodelamento do miocárdio. Importante destacar que tais alterações ocorreram independentemente da obesidade da prole, sugerindo um efeito decorrente da exposição intrauterina e durante a lactação à dieta materna desbalanceada.

## 2.7 Justificativa

A obesidade configura-se atualmente como um dos principais problemas de saúde pública com prevalência crescente em todo o mundo, segundo dados da OMS (2022). No Brasil, a situação segue a tendência mundial, com aumento progressivo dos índices de sobrepeso e obesidade em adultos (IBGE, 2020). A obesidade é considerada fator central no desenvolvimento de diversas comorbidades, especialmente as DCVs, diabetes tipo 2 e a SM.

Considerando que a obesidade e a hiperleptinemia, frequentemente associadas, desempenham papel determinante na ativação de vias moleculares que afetam diretamente a contratilidade, o metabolismo energético, a hipertrofia cardíaca e a pressão arterial, este trabalho destaca a importância de investigar os mecanismos fisiopatológicos subjacentes às alterações metabólicas induzidas pela programação da prole por DH materna durante a gestação e lactação, com foco especial no comprometimento da função cardíaca.

Modelos experimentais de programação metabólica têm sido fundamentais para compreender como fatores nutricionais, como o consumo materno de DH, influenciam negativamente a saúde da prole. Em nossos estudos prévios, verificamos que a exposição intrauterina e durante a lactação à DH compromete a função cardíaca da prole na fase jovem e adulta. Dessa forma, a análise da via de sinalização da leptina e do estresse oxidativo cardíaco torna-se essencial para a elucidação dos mecanismos moleculares envolvidos nas alterações estruturais e funcionais observadas no coração desses animais.

Compreender tais processos é fundamental não apenas para aprofundar o conhecimento sobre a fisiopatologia da programação metabólica por DH materna, mas também para subsidiar o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, tanto medicamentosas quanto não medicamentosas, como, por exemplo, a suplementação com antioxidantes não enzimáticos, que possam atenuar ou reverter os efeitos deletérios da programação por DH materna sobre o sistema cardiovascular da prole. Ademais, os achados deste estudo podem contribuir para o avanço de novas tecnologias voltadas à prevenção e ao tratamento das DCVs, com potencial impacto positivo sobre a saúde pública e a qualidade de vida da população.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do consumo materno de dieta hiperlipídica sobre os níveis plasmáticos de leptina e a expressão cardíaca de leptina, das proteínas envolvidas em sua via de sinalização celular e o estresse oxidativo no coração dos animais machos da prole ao desmame e na fase adulta.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

Ao desmame:

- Analisar o peso corporal;
- Avaliar a adiposidade das proles através do peso relativo dos reservatórios de tecido adiposo branco inguinal, epididimal e retroperitoneal;
- Dosar a leptina sérica;
- Analisar o peso relativo do coração como uma medida indireta de hipertrofia;
- Analisar a expressão cardíaca do receptor para leptina através da técnica de *Western blot*;

Na fase adulta:

- Analisar o peso corporal;
- Avaliar a adiposidade das proles através do peso relativo dos reservatórios de tecidos adiposos branco inguinal, epididimal e retroperitoneal;
- Dosar a leptina sérica;
- Avaliar o peso relativo do coração como uma medida indireta de hipertrofia;
- Avaliar a expressão cardíaca do RNAm da leptina por q-PCR;
- Analisar a expressão cardíaca a expressão proteica dos componentes da principal via de sinalização da leptina no coração: ObR, JAK-2, STAT-3, STAT-3p e SOCS-3; através da expressão cardíaca do receptor para leptina através da técnica de *Western blot*;
- Avaliar o estresse oxidativo no tecido cardíaco através da geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

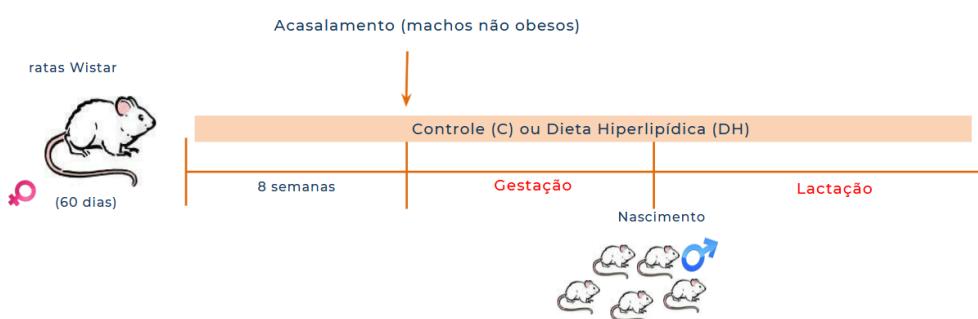
## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Ratos da linhagem *Wistar* foram adquiridos no biotério do Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) - Ciência em Animais de Laboratório (CAL). Esses animais foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), com controle de temperatura ( $22\pm1^{\circ}\text{C}$ ) e fotoperíodo (6:00-18:00h), e receberam ração e água *ad libitum*. O modelo experimental desta dissertação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo: 017/2014-CEUA/IB/UFRRJ).

### 4.2 Desenho Experimental

O desenho experimental utilizado neste trabalho foi adaptado de Franco e colaboradores (2012). Ratas *Wistar*, com aproximadamente 60 dias de idade, foram alocadas de forma aleatória em dois grupos. O grupo controle (C) foi constituído por 20 ratas, as quais receberam somente dieta normolipídica, contendo 9% de lipídios. O grupo dieta hiperlipídica (DH), também constituído por 20 ratas, receberam somente dieta hiperlipídica, contendo 29% de lipídios. As ratas receberam suas respectivas dietas durante 8 semanas antes do acasalamento, permaneceram sob as respectivas dietas durante todo o período de gestação e lactação das ninhadas (Figura 6).



**Figura 6.** Representação esquemática da obtenção do modelo experimental. Ratas *Wistar* ( $\pm 60$  dias) divididas aleatoriamente em Grupo controle (C), que receberam dieta controle normolipídica e Grupo dieta hiperlipídica (DH), por 8 semanas antes do acasalamento e durante toda a gestação e lactação das ninhadas. Fonte: Rangel (2022), adaptado de Franco e colaboradores (2012).

Durante todo esse período de 8 semanas, o ganho de peso corporal, assim como o consumo alimentar das matrizes foram acompanhados. Após esse período, as ratas de ambos os grupos foram acasaladas com ratos que receberam dieta normolipídica durante toda vida. No período do acasalamento, foi utilizado a proporção de um macho para cada duas fêmeas. A concepção foi confirmada após a visualização do *plug vaginal* e, a partir desse momento, as fêmeas consideradas grávidas foram separadas e mantidas em gaiolas individuais. Os filhotes das matrizes que receberam ração normolipídica formaram a prole Controle (C) e os filhotes das matrizes que receberam ração hiperlipídica deram origem à prole Dieta Hiperlipídica (DH). Ao nascimento, foram selecionados seis filhotes por ninhada e os grupos C e DH continuaram recebendo suas respectivas dietas durante a fase de gestação e lactação de seus filhotes (Figura 7).



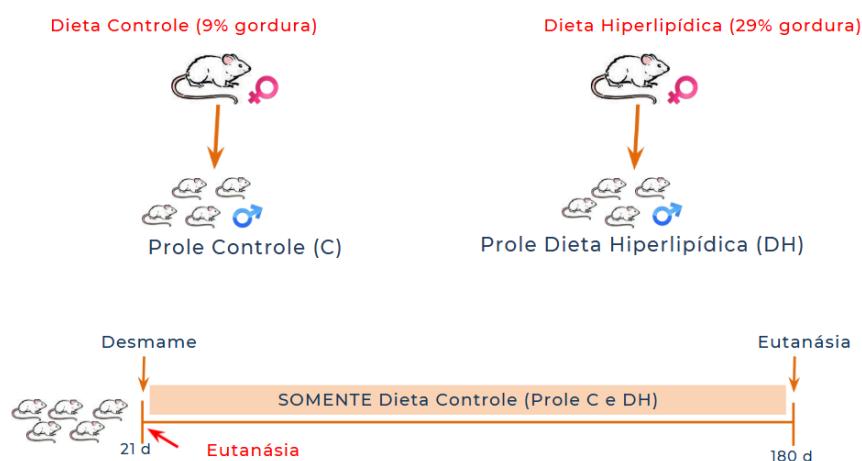
**Figura 7.** Representação esquemática da identificação das proles analisadas. As matrizes em dieta controle originaram a prole Controle (C) e as matrizes em dieta hiperlipídica originaram a prole Dieta Hiperlipídica (DH). Fonte: Rangel (2022), adaptado de Franco e colaboradores (2012).

A ração com alto teor de lipídeos foi produzida por nosso grupo de pesquisa no próprio laboratório. A tabela 1 descreve os ingredientes utilizados e suas concentrações.

**Tabela 1.** Composição da dieta hiperlipídica purificada 5400 cal/Kg (Prag Soluções®).

Produto	(p/p)	Calorias	Calorias (%)
<b>Amido de milho</b>	13,05	522	9,67
<b>Caseína</b>	18,70	748	13,85
<b>Amido Dextranizado</b>	13,20	528	9,78
<b>Sacarose</b>	10,00	400	7,41
<b>Óleo de soja</b>	4,00	360	6,67
<b>Celulose Microcristalina</b>	5,00	0	0,00
<b>MIX Mineral AIN 93 G</b>	3,50	0	0,00
<b>MIX Vitaminas AIN 93</b>	1,00	40	0,74
<b>L-Cistina</b>	0,30	12	0,22
<b>Cloreto de Colina</b>	0,25	0	0,00
<b>Banha</b>	31,00	2790	51,66
<b>Total</b>	<b>100,0</b>	<b>5400</b>	<b>100,0</b>

Aos 21 dias de idade, os animais das proles C e DH foram desmamados, parte desses animais foi eutanasiada, através de uma câmara de CO<sub>2</sub>, e o restante aos 180 dias de idade pelo método da guilhotina. Os animais que foram eutanasiados na fase adulta, após o desmame, foram realocados e a partir de então, os animais de ambas as proles receberam somente dieta normolipídica (Figura 8) até os 180 dias de idade.



**Figura 8.** Representação esquemática do acompanhamento das proles macho C e DH do desmame à idade adulta (180 dias). Ambas as proles receberam somente dieta controle normolipídica durante este período. Fonte: Rangel (2022).

No dia da eutanásia, os corações foram coletados, átrios e ventrículos foram separados e pesados. Em seguida os ventrículos esquerdos foram seccionados para serem utilizados nas seguintes análises moleculares: avaliação da expressão proteica pelo método de *Western Blotting*; avaliação da expressão gênica do RNAm da leptina por qPCR e produção de peróxido de hidrogênio. Essas amostras foram armazenadas a -80°C até o momento das análises.

O sangue foi coletado do tronco do animal e posteriormente centrifugado a 604 xg, durante 15 minutos, a 4°C e o soro armazenado a -20°C para posterior dosagem da leptina sérica através da técnica de Radioimuniensaio (RIA). Além disso, os tecidos adiposos brancos inguinal, retroperitoneal e perigonadal foram coletados e seus pesos mensurados. A tibia também foi coletada, dissecada, e o comprimento mensurado através do paquímetro. O comprimento da tibia em centímetros (cm) serviu como fator de normalização para as massas pesadas, o qual obteve a massa relativa dos tecidos através da razão entre peso de cada órgão e comprimento tibial.

#### **4.3 Avaliação da Hipertrofia Cardíaca**

O coração foi coletado e lavado em solução gelada de salina (NaCl 0,9%) tendo como objetivo a remoção de sangue e coágulos. Os átrios e ventrículos foram separados, secos em papel de filtro, pesados e seus valores anotados e normalizados pelo comprimento da tibia. O peso relativo do coração foi utilizado como um índice indireto de hipertrofia cardíaca (Otten *et al.*, 1986; Sjaastad *et al.*, 2000).

#### **4.4. Dosagem de Leptina Sérica**

A dosagem de leptina sérica das proles aos 21 e 180 dias de idade foi realizada através da técnica de RIA realizada no Departamento de Biofísica da UFRRJ, na qual utiliza-se um antígeno de interesse marcado com um isótopo radioativo, com uma quantidade conhecida de seu anticorpo para medir a concentração de抗ígenos, utilizando o kit comercial RIA kit Rat Leptin Millipore® (Cat. #RL-83R).

#### **4.5 Análise da Expressão de Proteínas da Via de Sinalização da Leptina (ObR, JAK2, STAT3, STAT3p e SOCS3)**

A proteína total foi extraída após a homogeneização de aproximadamente 40 mg de tecido ventricular das proles, em uma solução gelada de tampão de lise e um coquetel de inibidores de proteases (Complete, Roche®, Germany). Foi utilizado para a extração de proteínas o homogeneizador Turrax, com kit para quantificar no espectro e fazer a curva de proteína com albumina. As amostras de proteína foram fracionadas em géis de poliacrilamida. Após a eletroforese, as amostras foram transferidas para uma membrana de PVDF para posterior incubação com os anticorpos específicos.

As membranas, contendo as amostras proteicas foram incubadas com solução TBS contendo leite desnatado (Molico®) 5%, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após bloqueio e identificação das membranas, estas foram incubadas *overnight* em temperatura entre 4-10°C, na presença de diferentes diluições dos anticorpos policlonais para receptor de leptina (OBR) e proteínas da sua via de sinalização: JAK-2, STAT3, a sua isoforma fosforilada STAT3p e SOCS3 (Santa Cruz Biotechnology®). A expressão de GAPDH (Affinity Bioreagents®) e ciclofilina (Affinity Bioreagents®) foram usados como controle interno. Os anticorpos foram diluídos em solução TBS, contendo leite desnatado (Molico) 2%.

No dia seguinte, as membranas foram incubadas a 25°C durante 2 horas, na presença do anticorpo secundário contra IgG de coelho conjugado a peroxidase ou contra IgG de camundongo conjugado a biotina (Santa Cruz Biotechnology®) diluído em TBS, contendo Molico 1%, em diferentes concentrações. Nova incubação com Estreptavidina foi necessária ao utilizar-se o anticorpo conjugado à biotina, por 1 hora. Entre as incubações, as membranas passaram por lavagens com TBS-T 0,1%.

Após este procedimento a membrana recebeu mais lavagens com TBS-T 0,1%, e foi revelada utilizando o método de luminescência não radioativa de detecção de抗ígenos específicos imobilizados (ECL Western Blotting System – Amersham Biosciences®), segundo protocolo do fabricante. Os híbridos foram visualizados através de auto-radiografia e a análise densitométrica realizada utilizando o Software Image J.

Os valores da concentração proteica, concentração do gel de poliacrilamida, diluição dos anticorpos primários, secundários e da Estreptavidina, de acordo com a proteína da via de sinalização da leptina analisada foram listados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Condições experimentais padronizadas para cada anticorpo.

Proteína	[proteína] μg	% do Gel	[Anticorpo primário]	[Anticorpo secundário]	[Estreptavidina]
OBR	30	10	1:500	1:10000	1:400000
JAK2	20	15	1:400	1:10000	1:400000
STAT3	20	15	1:300	0,6:10000	1:400000
STAT3p	20	15	1:400	1:10000	1:400000
SOCS3	30	10	1:300	1:10000	1:400000
GAPDH	20 a 30	10 e 15	1:800	1,2:10000	1:400000
Ciclofilina	20 a 30	10 e 15	1:90000	1,2:10000	1:400000

#### 4.6 Quantificação da Expressão Gênica do RNAm da Leptina

O RNA total do tecido ventricular cardíaco foi obtido utilizando o reagente TRIZOL (Invitrogen, USA), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. Foi adicionado 1 mL de TRIZOL a 100 mg das amostras, em seguida estas foram homogeneizadas usando um processador ultra-turrax e incubadas, por 10 minutos, à temperatura. Após a incubação foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (SIGMA, USA) a cada uma das amostras, e estas foram incubadas por 5 minutos, e então centrifugadas a 12000 xg por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para tubos tipo *eppendorf*, novos, e o RNA

precipitado com 0,5 mL de isopropanol (SIGMA, USA). As amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugadas por 10 minutos a 12000 xg. O precipitado de RNA, resultante da centrifugação, foi lavado com 1 mL de etanol 70% (SIGMA, USA), seco à temperatura ambiente e solubilizado em água tratada com DEPC (SIGMA, USA).

A concentração do RNA obtido foi determinada por espectrofotometria a 260 nm e sua integridade foi confirmada por visualização do RNA em gel de agarose 1% em TAE 1x. As amostras contendo o RNA íntegro foram armazenadas a -20°C para posterior obtenção do cDNA.

#### **4.6.1 Transcrição reversa**

A reação de transcrição reversa foi realizada utilizando a enzima Superscript III (Invitrogen, USA) e oligo(dT) em um volume final de 20 mL conforme o protocolo do fabricante. Nesta reação 1 micrograma do RNA total de cada amostra foi incubado com oligo(dT), dNTPs (10 mM de cada - dATP, dCTP, dGTP, dTTP- PROMEGA, USA) e água tratada com DEPC a 65°C por 5 minutos em um termociclador *MWG Biotech-Primus*. Foram acrescentados a reação, tampão *first strand*, 5 mM DTT e 50 U/mL da enzima Superscript III, e incubados novamente a 42°C por 50 minutos. A reação foi finalizada incubando a 70°C por 15 minutos. O cDNA obtido foi armazenado a -20°C até a sua utilização.

#### **4.6.2 PCR em tempo real**

O cDNA foi adicionado a uma placa de reação junto com uma mistura contendo os iniciadores específicos, água deionizada autoclavada e tampão SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), que contém 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl pH 8,4, 0,4 mM de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 50 U/mL Taq DNA polimerase, 6 mM MgCl<sub>2</sub> , SYBR Green I e 20 nM fluoresceína. As amostras foram analisadas em duplicata.

A quantificação da expressão dos genes foi realizada na máquina de Real-Time PCR (Applied Biosystems, EUA), que detecta mudanças na concentração das amostras por fluorescência. Após desnaturação inicial à 50° C por 2 minutos e à 95° C por 10 minutos, as reações de amplificação seguiram parâmetros específicos que estão descritos na tabela 3,

assim como as diluições de cada cDNA utilizadas para cada iniciador. A fluorescência do SYBR Green foi medida ao final de cada ciclo para monitorar a quantidade do produto amplificado formado durante a ciclagem. O gene 36b4 foi utilizado como controle interno nas reações de amplificação. A sequência dos iniciadores está descrita na tabela 4 (Cordeiro *et al.*, 2013).

No presente trabalho, utilizamos o método de quantificação relativa das amostras que descreve as mudanças na expressão do gene alvo leptina no grupo experimental em relação à expressão do grupo controle, que foi considerado como 1. Os níveis relativos de RNAm foram determinados pela comparação do limiar (*threshold*) dos ciclos (Ct, do inglês *cycle threshold*) de PCR entre os grupos. A normalização pelo controle interno, cuja expressão não se altera nas diferentes manipulações do estudo, foi feita subtraindo o valor do Ct do gene em estudo do valor do Ct do 36b4 e esses valores obtidos foram submetidos à fórmula  $2^{\Delta Ct}$  (Ponchel, 2003) e em seguida às análises estatísticas.

**Tabela 3.** Condições da reação de PCR em tempo real para os iniciadores específicos.

Iniciadores	Diluição do cDNA	Ciclos	Condições para a amplificação					
			Desnaturação	Duração	Anelamento	Duração	Polimerização	duração
Lep/36 $\beta$ 4	1:10	40	95°C	15"	53°C	30"	70°C	45"

**Tabela 4.** Iniciadores utilizados na reação de PCR em tempo real.

Iniciador	Direto	Reverso
Leptina	5'CATCTGCTGGCCTCTCAA3'	5'ATCCAGGCTCTGGCTCTG3'
36 $\beta$ 4	5'TGTTGACAACGGCAGCATT3'	5'CCGAGGCAACAGTTGGGTA3'

#### **4.7 Quantificação Cardíaca de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**

O estresse oxidativo no tecido cardíaco da prole aos 180 dias de idade foi avaliado através da quantificação de peróxido de hidrogênio. A geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi quantificada pelo método AmplexRed / HRP (Molecular Probes), que detecta o acúmulo de produtos oxidados fluorescentes. As amostras do ventrículo foram homogeneizadas em tampão fosfato e em seguida incubadas com tampão fosfato de sódio 0,3M, pH 7,2; EGTA 1mM, superóxido dismutase (100U/mL; Sigma), horseradish peroxidase (0,5U/ml; Roche), Amplex red (50µM; Molecular Probes), NADPH (1mM) e a fluorescência emitida foi medida imediatamente no leitor de microplacas (Victor3, Perkin Elmer) utilizando os comprimentos de onda de excitação em 530nm e emissão em 595nm (Fortunato *et. al.*, 2010). A atividade enzimática específica foi expressa em nanomoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por hora, por miligrama de proteína (nmol.h<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>).

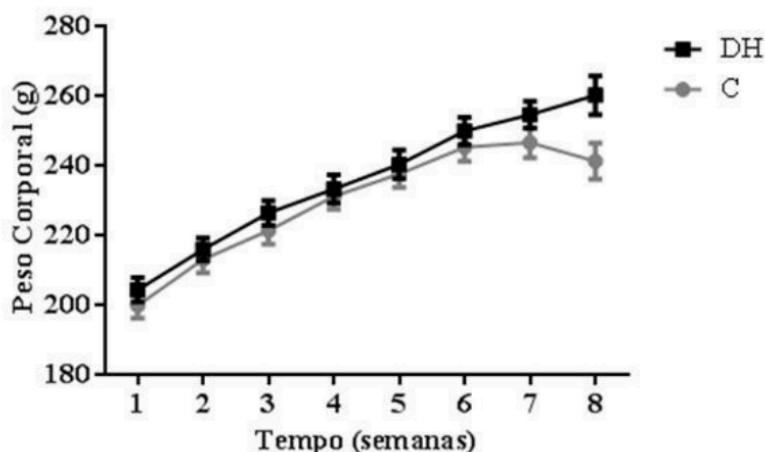
#### **4.8 Análise Estatística**

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste t-*Student* não-pareado e análise de variância uni- ou bi-variada foram utilizados quando necessários. Testes não-paramétricos (Kruskall-Wallis para mais de 2 grupos e Mann-Whitney para até dois grupos) foram realizados para os valores que não apresentaram distribuição normal. Diferenças foram consideradas significativas quando  $p<0,05$ . O programa estatístico GraphPad Prism 9 foi utilizado para o tratamento dos dados.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Acompanhamento da Massa Corporal e Ingestão Alimentar das Matrizes Durante o Consumo das Dietas

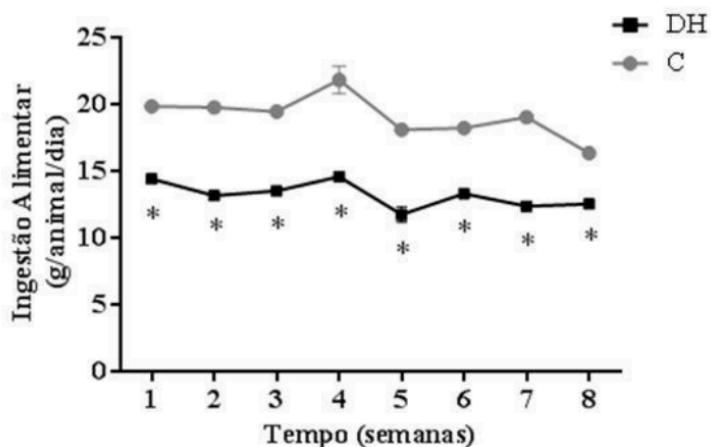
Para avaliar os possíveis efeitos do consumo de DH sobre a massa corporal e a ingestão alimentar das matrizes, foi realizado o acompanhamento a cada sete dias, durante oito semanas. A análise da evolução da massa corporal revelou que não houve alterações significativas entre os grupos C e DH ao longo das semanas que antecederam o acasalamento (Figura 9).



**Figura 9.** Evolução do ganho de massa corporal (g) das matrizes dos grupos C (n=20) e DH (n=20) ao longo de 8 semanas antes do acasalamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Teste Two-Way ANOVA, seguido de pós-teste Sidak.

Em relação à ingestão alimentar das matrizes, durante as oito semanas, avaliamos a diferença entre a quantidade (g) inicial e final de ração fornecida semanalmente para cada rata. Observamos que, na primeira semana, as matrizes DH consumiram 37% menos ração em comparação às fêmeas do grupo C. Essa redução persistiu ao longo das semanas seguintes, com uma ingestão 50% menor na segunda semana e 43% menor na terceira. Na quarta e quinta semanas, o consumo alimentar permaneceu reduzido em aproximadamente 50% e 54%, respectivamente. Na sexta semana, a diferença no consumo entre os grupos C e DH foi

de cerca de 38%, enquanto na sétima semana a redução atingiu aproximadamente 54%. Por fim, na oitava semana, as ratas DH ingeriram 30% menos ração em relação às fêmeas do grupo C (Figura 10).



**Figura 10.** Ingestão alimentar (g/animal/dia) das matrizes dos grupos C (n=20) e DH (n=20) ao longo das 8 semanas anteriores ao acasalamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. \*  $p<0,05$ . Teste Two-Way ANOVA, seguido de pós-teste de Sidak.

## 5.2 Acompanhamento dos Animais Machos das Proles do Nascimento ao Desmame (21 Dias de Idade)

Ao nascimento, os filhotes das matrizes do grupo C compuseram a prole C, enquanto os das matrizes do grupo DH formaram a prole DH. Para evitar variações significativas no tamanho das ninhadas, foram selecionados aleatoriamente seis filhotes por matriz.

No grupo C, das 20 matrizes submetidas à dieta, 16 geraram ninhadas viáveis, totalizando 96 filhotes, sendo 49 machos e 47 fêmeas. Durante a lactação, dois filhotes machos foram descartados ou morreram devido a discrepâncias no crescimento, apresentando baixo peso em relação ao restante na dinhada. Assim, ao desmame, permaneceram 47 machos e 47 fêmeas.

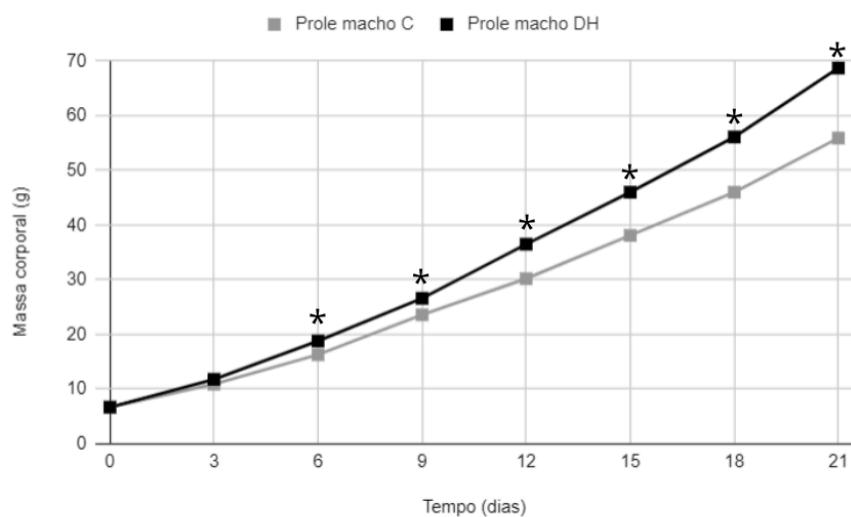
No grupo DH, das 20 matrizes submetidas à dieta hiperlipídica, apenas 10 ninhadas foram obtidas, resultando em um total de 60 filhotes, dos quais 29 eram machos e 31 fêmeas. Durante a lactação não houve perdas nesse grupo, mantendo-se o mesmo número de filhotes ao desmame.

Para a realização dos ensaios experimentais foi selecionado um filhote macho por ninhada após o desmame.

### 5.2.1 Peso corporal dos filhotes do nascimento ao desmame

Para avaliar o impacto da dieta hiperlipídica materna no ganho de peso da prole, o peso dos filhotes foi monitorado a cada três dias, do nascimento até o desmame, aos 21 dias de idade. A evolução do peso dos 47 filhotes machos da prole C e dos 29 filhotes machos da prole DH está apresentada na figura.

A partir do 6º dia pós-natal, os filhotes machos da prole DH começaram a apresentar aumento de peso significativo em comparação aos da prole C, com incremento de aproximadamente 15% nos dias 6 e 9, atingindo 23% no final da lactação (0 dia: Machos C=  $6,7 \pm 0,1$ g; DH=  $6,7 \pm 0,1$ g; 3º dia: C=  $10,9 \pm 0,2$ g; DH=  $11,8 \pm 0,3$ g; 6º dia: C=  $16,3 \pm 0,3$ g; DH=  $18,8 \pm 0,4$ g; 9º dia: C=  $23,6 \pm 0,3$ g; DH=  $26,6 \pm 0,4$ g; 12º dia: C=  $30,2 \pm 0,4$ g; DH=  $36,5 \pm 0,3$ g; 15º dia: C=  $38,1 \pm 0,4$ g; DH=  $46,0 \pm 0,4$ g; 18º dia: C=  $46,0 \pm 0,5$ g; DH=  $56,1 \pm 0,4$ g; 21º dia: C=  $55,9 \pm 0,7$ g; DH=  $68,7 \pm 0,8$ g) (Figura 11).



**Figura 11.** Evolução da massa corporal dos filhotes machos das proles C (n=47) e DH (n=29), durante todo o período de lactação. Os dados estão expressos como média ± erro padrão. \*p<0,05. Teste two-way ANOVA seguido de pós-teste Sidak.

Durante todo o período de amamentação, os filhotes machos da prole C não mostraram variações estatisticamente significativas no peso. Esses achados sugerem que a ingestão materna de uma dieta hiperlipídica promove maior ganho de peso na prole macho DH em comparação a prole macho C (Figura 11).

### 5.2.2 Avaliação do peso dos tecidos adiposos inguinal, retroperitoneal e epididimal, e do coração

Para determinar se o aumento do peso corporal observado ao desmame estava associado ao aumento na adiposidade, foram analisados os depósitos de tecido adiposo visceral (retroperitoneal e epididimal) e subcutâneo (inguinal). Para esta medição o peso do TAB foi corrigido pelo comprimento da tibia. A análise do TAB retroperitoneal revelou que os filhotes machos da prole DH apresentaram aumento em 1,51x comparado ao controle, aos 21 dias de idade (Tabela 5). A avaliação do TAB epididimal mostrou que a prole DH apresentou aumento de 1,27x na adiposidade deste compartimento em comparação aos machos da prole C (Tabela 6), aos 21 dias de idade. Esses achados sugerem que a dieta hiperlipídica das matrizes contribui para maior acúmulo de gordura visceral na prole DH.

**Tabela 5.** Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade.

Prole	Peso relativo do TAB retroperitoneal (mg/cm)
Machos C	0,008673 ± 0,00055
Machos DH	0,021810 ± 0,00076*

Os dados são expressos como média ± erro padrão. Machos C (n = 12), machos DH (n = 8). \*p<0,05. Teste t-Student.

**Tabela 6.** Peso relativo do tecido adiposo epididimal dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade.

Prole	Peso relativo do TAB epididimal (mg/cm)
Machos C	0,008387 ± 0,00048
Machos DH	0,01905 ± 0,00108*

Os dados são expressos como média ± erro padrão. Machos C (n = 14), machos DH (n = 8). \*p<0,05. Teste t-Student.

Em relação ao TAB subcutâneo, o compartimento inguinal mostrou aumento de 1,11x da adiposidade nos filhotes machos da prole DH em comparação aos da prole C (Tabela 7), indicando que o consumo materno de dieta hiperlipídica promoveu maior deposição de gordura subcutânea.

**Tabela 7.** Peso relativo do tecido adiposo inguinal dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade.

Prole	Peso relativo do TAB inguinal (mg/cm)
Machos C	0,04326 ± 0,00273
Machos DH	0,09136 ± 0,0035*

Os dados são expressos como média ± erro padrão. Machos C (n = 13), machos DH (n = 7). \*p<0,05. Teste t-*Student*.

Além da composição corporal, a influência da DH das progenitoras na massa cardíaca da prole foi investigada. Foram analisados o peso relativo do coração (mg), corrigido pelo comprimento da tibia (cm), usado como índice de hipertrofia cardíaca.

Observou-se que os filhotes machos da prole DH apresentaram aumento na massa relativa do coração em comparação aos machos da prole C. Ao pesar separadamente as câmaras cardíacas, constatamos que os machos das proles C e DH não apresentaram diferenças significativas na massa atrial. No entanto, evidenciamos que a massa total do ventrículo foi maior em machos da prole DH, 24,3%, quando comparados à prole C (Tabela 8). Esses dados indicam que o consumo materno de DH promove aumento do peso relativo do coração e do ventrículo sugerindo hipertrofia cardíaca, no entanto como é uma medida indireta, há necessidade de técnicas de maior precisão para fazer essa afirmação.

**Tabela 8.** Peso do coração (mg) corrigida pelo comprimento da tíbia (cm) e peso dos ventrículos das proles C e DH aos 21 dias.

Prole	Peso relativo do coração (mg/cm)	Peso dos ventrículos (mg/cm)	Peso dos átrios (mg/cm)
Machos C	0,0141±0,00038	0,01322±0,00034	0,0008857±0,0000065
Machos DH	0,01741±0,00057*	0,01643±0,00055*	0,00097±0,0000062

Os dados são expressos como média ± erro padrão. Machos C (n=13), machos DH (n=8). \*p<0,05. Teste t-Student.

### 5.2.3 Avaliação da leptina sérica

Devido ao aumento na adiposidade dos animais da prole DH avaliamos se a elevação do TAB poderia resultar em aumento da concentração sérica de leptina. A avaliação foi realizada por RIA a partir do soro coletado de ambas as proles aos 21 dias de idade (Tabela 9). Os filhotes machos da prole DH apresentaram aumento superior a 62% na concentração sérica de leptina em comparação aos machos da prole C.

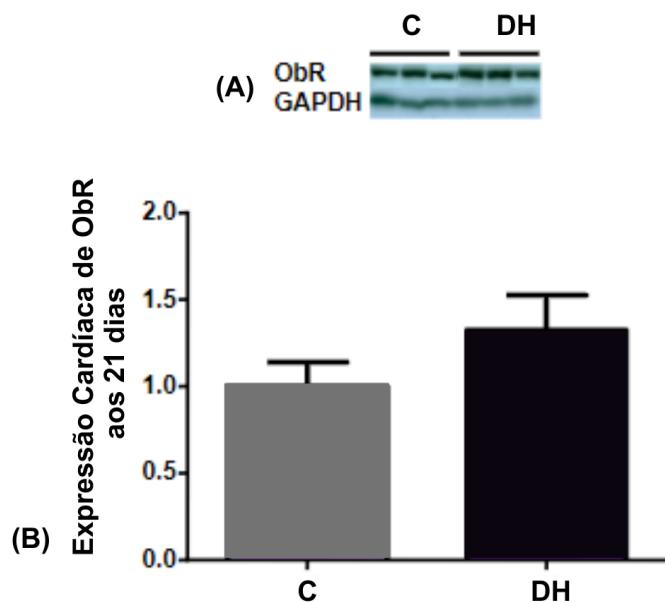
**Tabela 9.** Concentração sérica de leptina da prole C e DH aos 21 dias de idade.

Leptina sérica (ng/mL)	Grupo Prole Controle (C)	Grupo Prole DH (DH)
Filhotes (21 dias)	3,2 ± 0,2	5,3 ± 0,6*

Os valores estão expressos como média ± erro padrão. Machos C (n = 8), machos DH (n =8). \*p<0,05. Teste t-Student.

### 5.2.4 Avaliação do conteúdo proteico do receptor ObR no coração das proles

A expressão protéica foi analisada através da técnica de Western blotting. A avaliação da expressão proteica do receptor ObR no coração dos animais aos 21 dias de idade não revelou diferenças significativas entre as proles DH e C (Figura 12).

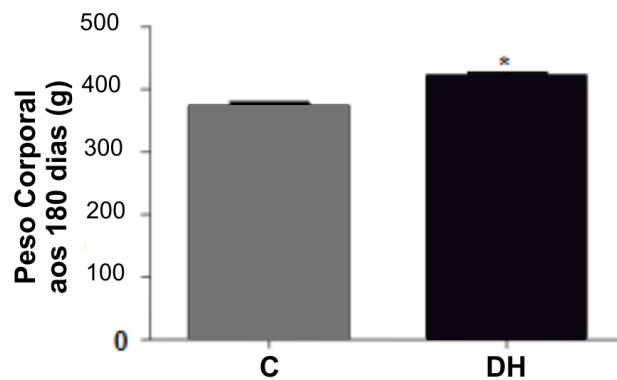


**Figura 12.** Expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 21 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos machos das proles C (n=7) e DH (n=7). Dados expressos como média ± erro padrão da média. Teste *t*-Student.

### 5.3 Acompanhamento da Prole Macho do Desmame à Idade Adulta (180 dias)

#### 5.3.1 Peso corporal da prole do desmame à idade adulta

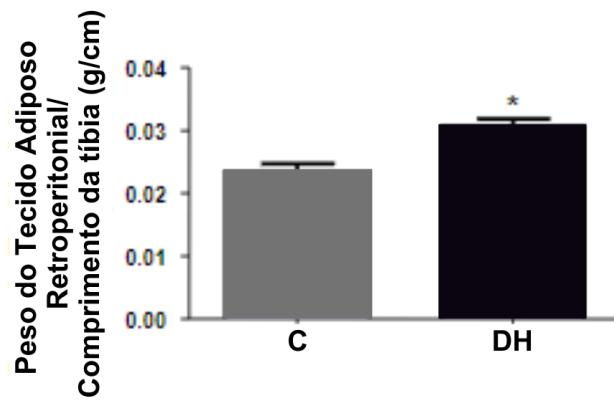
A partir do desmame, ambos os grupos, prole macho C e DH, foram alimentados somente com a ração normolipídica durante todo o experimento. A avaliação do impacto nutricional das progenitoras no ganho de peso corporal da prole foi mensurada aos 180 dias, demonstrando que os animais tiveram aumento no peso corporal em relação ao controle (Figura 13).



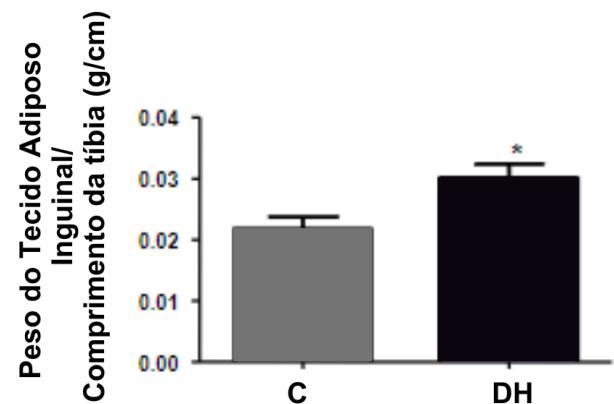
**Figura 13.** Peso corporal dos animais machos da prole C e DH aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 9).  
 $*p < 0,05$ . Teste t-Student.

### 5.3.2 Avaliação do peso dos tecidos adiposos inguinal, retroperitoneal e epididimal, e do coração

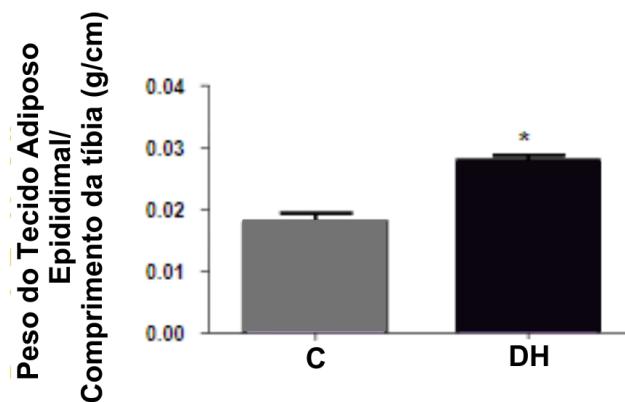
Aos 180 dias de idade, imediatamente após a eutanásia, os tecidos adiposos brancos viscerais (retroperitoneal e epididimal) e subcutâneo (inguinal) foram coletados e pesados. Para essa análise, os pesos dos tecidos adiposos foram corrigidos pelo comprimento da tibia. Verificamos que a prole DH teve aumento do TAB em todos os compartimentos analisados em comparação ao controle (Figuras 14, 15 e 16), o que justifica o aumento de peso observado anteriormente. Nossos resultados sugerem que o consumo de dieta hiperlipídica pelas matrizes resultou no aumento da adiposidade na prole DH adulta.



**Figura 14.** Peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal das proles C e DH, aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 8). \*p<0,05. Teste t-Student.



**Figura 15.** Peso relativo do tecido adiposo inguinal das proles C e DH, aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 8). \*p<0,05. Teste t-Student.



**Figura 16.** Peso relativo do tecido adiposo epididimal das proles C e DH, aos 180 dias de idade. Os valores estão expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n = 7), machos DH (n = 8). \*\*\*p<0,001. Teste t-Student.

A análise do peso relativo do coração, o peso dos átrios e ventrículos revelou que os animais do grupo DH não apresentaram diferenças estatísticas em relação à prole C (Tabela 10). Esses achados sugerem que a programação fetal induzida pela DH das matrizes não resultou em alterações destes parâmetros. No entanto, análises morfológicas são necessárias para confirmar a presença ou ausência de hipertrofia, além de fibrose cardíaca.

**Tabela 10.** Peso do coração (g) corrigida pelo comprimento da tibia (cm) e peso dos ventrículos das proles C e DH aos 180 dias de idade.

Prole	Peso relativo do coração (g/cm)	Peso dos ventrículos (g/cm)	Peso dos átrios (g/cm)
Machos C	0,3775 $\pm$ 0,01	0,3588 $\pm$ 0,01	0,02 $\pm$ 0,01
Machos DH	0,3597 $\pm$ 0,01	0,3403 $\pm$ 0,02	0,0197 $\pm$ 0,001

Os dados são expressos como média  $\pm$  erro padrão. Machos C (n=13), machos DH (n=8). Teste t-Student.

### 5.3.3 Avaliação da leptina sérica

Aos 180 dias de idade, os níveis séricos de leptina dos animais do grupo DH eram aproximadamente cinco vezes mais elevados em comparação ao grupo C. As proles DH aos 21 e 180 dias apresentaram níveis séricos elevados de leptina em função do maior peso da

massa adiposa, em comparação às proles C nos mesmos períodos (Tabela 11). A elevação do acúmulo de TAB no organismo do animal resulta em maior produção de leptina pelo mesmo.

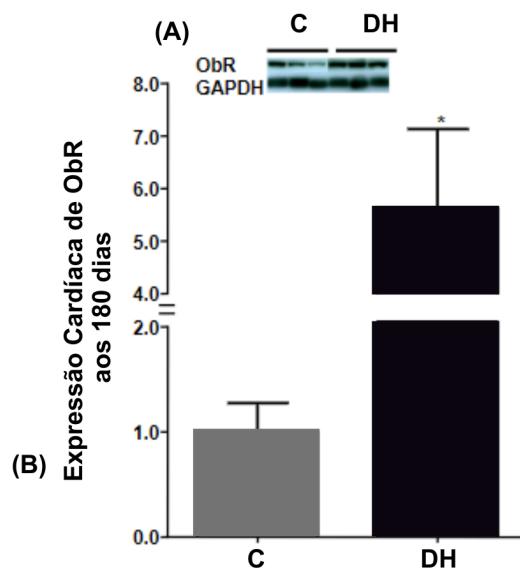
**Tabela 11.** Concentração sérica de leptina da prole C e DH aos 180 dias de idade.

Leptina sérica (ng/mL)	Grupo Prole Controle (C)	Grupo Prole DH (DH)
Adultos (180 dias)	4,6 ± 0,6	18,4 ± 5,0*

Os valores estão expressos como média ± erro padrão. Machos C (n = 8), machos DH (n = 8). \*p<0,05. Teste t-Student.

### 5.3.4 Análise da via de sinalização da leptina: expressão cardíaca do receptor ObR, JAK-2, STAT-3, STAT-3p, SOCS-3

Conforme visto anteriormente, a avaliação da expressão proteica do receptor ObR no coração dos animais aos 21 dias de idade não revelou diferenças significativas entre as proles DH e C. No entanto, aos 180 dias de idade, observou-se um aumento significativo na expressão do ObR no grupo DH em comparação ao grupo controle (Figura 17).

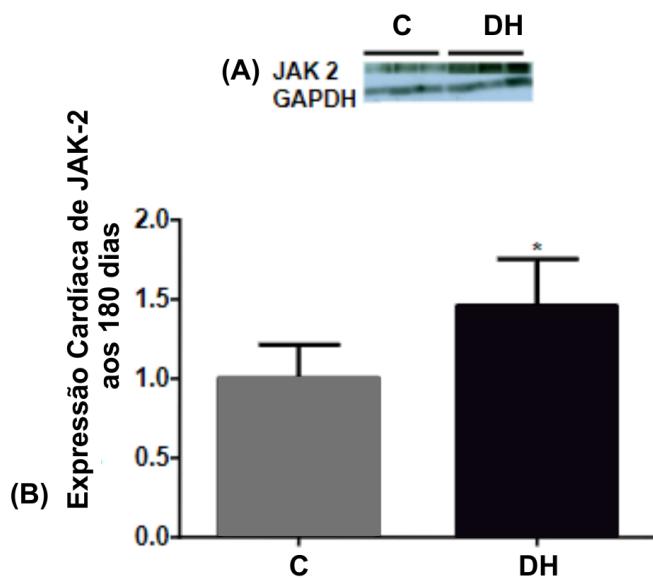


**Figura 17.** Expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B)

Análise densitométrica da expressão proteica do receptor ObR na parede livre do VE dos machos das proles C (n=5) e DH (n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média.

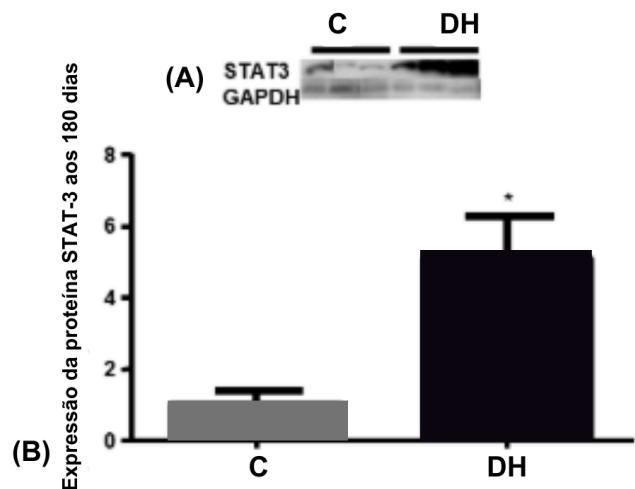
\*p<0,05. Teste t-Student.

A expressão cardíaca da proteína JAK-2 estava elevada na prole DH em relação ao controle, aos 180 dias (Figura 18).

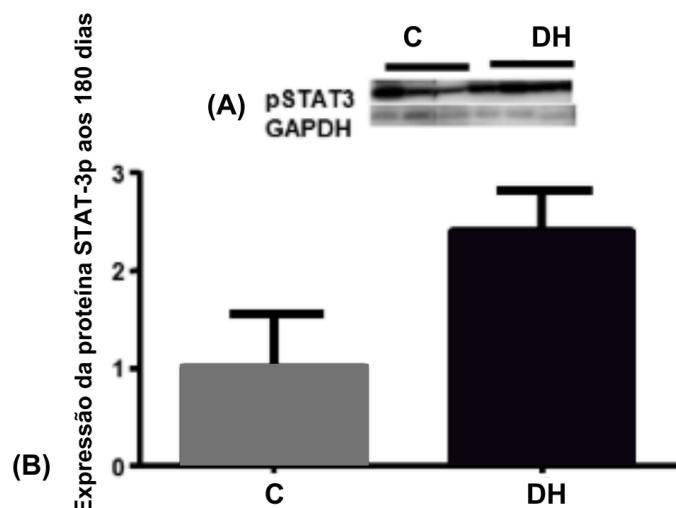


**Figura 18.** Expressão proteica de JAK-2 na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica de JAK-2 na parede livre do VE dos machos das proles C (n=4) e DH (n=6). Dados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  
\*p<0,05. Teste t-Student.

Aos 180 dias, verificou-se aumento na expressão proteica de STAT-3, mas não da sua isoforma fosforilada STAT-3p no grupo DH em relação ao grupo controle (Figuras 19 e 20, respectivamente).

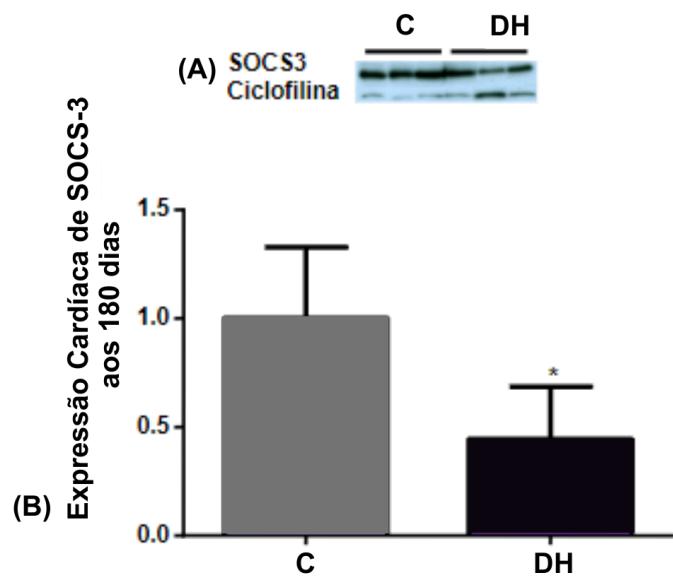


**Figura 19.** Expressão proteica de STAT-3 na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica de STAT-3 na parede livre do VE dos machos das proles C (n=5) e DH (n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média.



**Figura 20.** Expressão proteica de STAT-3p na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de GAPDH foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica de STAT-3p na parede livre do VE dos machos das proles C (n=5) e DH (n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média. Teste t-Student.

Analisamos a expressão da proteína SOCS-3 no coração, uma vez que esta proteína é um inibidor da principal via de sinalização da leptina (via JAK2-STAT3), atuando por feedback negativo intracelular, a SOCS-3 inibe a fosforilação de JAK-2 e STAT-3, representando a ativação ou não da via. Nossos dados indicam a redução da expressão cardíaca de SOCS-3 na prole DH aos 180 dias de idade (Figura 21).

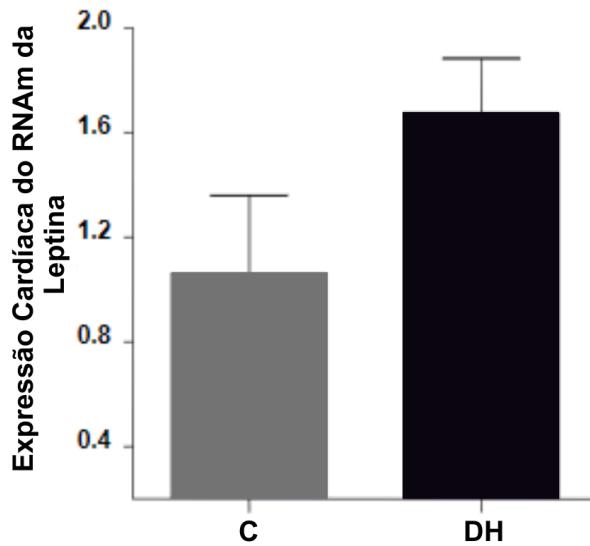


**Figura 21.** Expressão proteica de SOCS3 na parede livre do VE dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A) Imagem representativa da membrana de PVDF do experimento de western blot, a expressão de Ciclofilina foi usada como controle interno. B) Análise densitométrica da expressão proteica de SOCS3 na parede livre do VE dos machos das proles C (n=6) e DH (n=6). Dados expressos como média ± erro padrão da média.

\*p<0,05. Teste t-Student.

### 5.3.5 RNAm para leptina

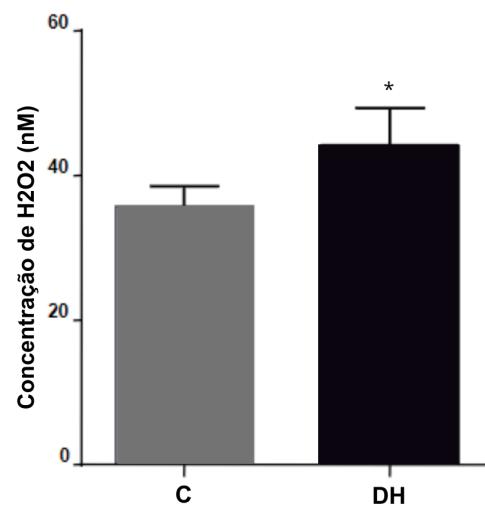
Realizamos a análise da expressão cardíaca do RNAm para Leptina no coração, uma vez que já foi demonstrado que há expressão deste hormônio pelos cardiomiócitos de indivíduos com elevada adiposidade, sugerindo que este hormônio pode agir de forma parácrina e autócrina no coração. O resultado indica que não houve diferença significativa na expressão cardíaca do RNAm para leptina entre as proles C e DH (Figura 22).



**Figura 22.** Expressão cardíaca do RNAm da leptina dos animais machos das proles C e DH aos 180 dias de idade. A expressão de  $36\beta 4$  foi usada como controle interno. Machos C (n = 3), machos DH (n = 6). Dados expressos como média ± erro padrão da média. Teste t-Student.

### 5.3.6 Geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas proles C e DH adulta

Para a avaliação do estresse oxidativo no coração da prole adulta (180 dias), analisamos a produção cardíaca de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A prole DH apresentou maior geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparada à prole C (C = 35,66 ± 2,89; OM = 44,12 ± 2,34 nM/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Figura 23).



**Figura 23.** Geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das proles C e DH aos 180 dias de vida. Machos C (n = 5), machos DH (n = 6). Os dados estão expressos como média ± erro padrão da média, \*p=0,054. Teste t-Student.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o impacto da dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação de ratas *Wistar* sobre a adiposidade, leptinemia, a expressão cardíaca da via de sinalização da leptina e o estresse oxidativo no coração da prole de animais machos ao desmame e na fase adulta. Para isso realizamos análises de peso corporal, peso relativo de reservatórios de tecido adiposo branco, da leptina sérica, expressão cardíaca de proteínas que participam da via de sinalização da leptina, RNAm para leptina e dosamos a produção de peróxido de hidrogênio no coração da prole.

O crescimento da incidência de distúrbios metabólicos, incluindo obesidade e SM, é atribuído à complexa interação entre fatores genéticos, ambientais e comportamentais ao longo da vida (Mandy; Nyirenda, 2018; Habbout *et al.*, 2013; Chen; Kelly, 2005). A compreensão dos fatores envolvidos na origem do aumento da adiposidade pode ser uma estratégia relevante para sua prevenção e controle na população (Blüher, 2019; Scheidl *et al.*, 2023).

O período gestacional é considerado uma janela crítica para a programação metabólica, pois é caracterizado por intensa replicação celular e desenvolvimento de órgãos e sistemas (Puche-Juarez *et al.*, 2023; Tain; Hsu, 2022). Evidências científicas apontam que doenças crônicas podem ser programadas ainda nas fases iniciais da vida, como demonstrado em estudos que analisam o impacto do tabagismo materno (Mandy; Nyirenda, 2018; Chen; Kelly, 2005), diabetes gestacional e obesidade materna sobre a saúde da prole (Marousez; Lesage; Eberlé, 2019; Samuelsson *et al.*, 2008).

Para reproduzir experimentalmente a elevação da adiposidade presente na sociedade ocidental, são utilizadas diferentes composições dietéticas. Dentre as estratégias mais empregadas estão dietas ricas em lipídios e/ou carboidratos simples, além da chamada “dieta de cafeteria”, que simula a alimentação humana contemporânea (Habbout *et al.*, 2013). Embora esta última forneça um modelo mais realista, a diversidade de macronutrientes dificulta a identificação dos efeitos específicos de cada componente sobre a prole.

Visando minimizar essa limitação, foi adotada neste estudo uma dieta hiperlipídica (DH) predominantemente composta por gordura saturada de origem animal, permitindo a avaliação isolada desse fator. Dietas hiperlipídicas geralmente possuem um teor lipídico

superior a 40% e são hiper energéticas em comparação às dietas padrão (Habbout *et al.*, 2013; Samuelsson *et al.*, 2013b). A literatura sugere que o maior conteúdo lipídico na dieta acelera o desenvolvimento da obesidade, pois os lipídios exercem um efeito dose-dependente sobre a expressão gênica relacionada ao metabolismo lipídico, particularmente no intestino delgado, promovendo um ambiente favorável ao ganho de peso (Samuelsson *et al.*, 2013b).

Buscando evitar os impactos deletérios de uma dieta altamente calórica baseada em gorduras, a dieta empregada neste estudo foi formulada com um teor lipídico moderado, 29% superior ao das dietas normolipídicas (Tabela 1). Dessa forma, as progenitoras submetidas a essa dieta não apresentaram variações superiores a 5% na massa corporal antes da concepção (Figura 9), em concordância com investigações anteriores do nosso grupo de pesquisa que utilizaram o mesmo protocolo experimental (Franco *et al.*, 2012).

Análises realizadas por Franco *et al.* (2012) utilizando absorciometria de raios-X de dupla energia (DEXA, do inglês, *dual energy X-ray absorptiometry*) indicaram aumento na adiposidade das ratas submetidas à DH, apesar da ausência de ganho de massa corporal. Woods e colaboradores (2003) também descreveram esse fenômeno em modelos experimentais semelhantes. Além disso, nossos achados demonstram redução na ingestão alimentar das progenitoras em dieta hiperlipídica, com redução entre 30% e 35% em relação ao grupo controle (Figura 10). Esse fenômeno já foi documentado em ratos machos (Woods *et al.*, 2003) e pode estar relacionado ao efeito sacietogênico dos lipídios, uma vez que sua digestão ocorre de forma mais lenta em comparação com os carboidratos, resultando em maior eficiência calórica das dietas ricas em gorduras (Ble-Castillo *et al.*, 2012). As matrizes do nosso estudo também não desenvolveram obesidade nas semanas que antecederam o acasalamento, ainda que a quantidade calórica da dieta tenha sido maior que a do grupo controle.

A exposição prolongada a DH leva a adaptações no trato gastrointestinal para otimizar a digestão e absorção de lipídios, incluindo o aumento da captação intestinal e redução da excreção de gorduras, além da maior expressão de enzimas digestivas e hipertrofia da mucosa intestinal. Essas alterações podem contribuir para a maior eficiência energética observada nos indivíduos submetidos a esse tipo de dieta (Covasa, 2010).

Em relação às proles macho do nosso experimento, ao nascimento, não foram detectadas diferenças significativas no peso corporal entre os grupos C e DH (Figura 11), o

que está de acordo com a literatura (Franco *et al.*, 2012; Desai *et al.*, 2014). Contudo, a partir do 6º dia pós-natal, os filhotes machos da prole DH apresentaram aumento significativo de peso em relação à prole C, atingindo aumento de 23% ao final da lactação. Esses dados indicam que a dieta hiperlipídica das matrizes contribui para o maior ganho de peso nos machos da prole DH.

Estudos prévios demonstraram que o leite de ratas Sprague Dawley submetidas a DH e ricas em açúcares apresenta maior concentração de colesterol, ácidos graxos livres (com predomínio de ácidos graxos ômega-6 em relação ao ômega-3), triglicerídeos e glicose entre o 9º e o 11º dia de lactação (Kirk *et al.*, 2009). Investigações realizadas pelo nosso grupo, utilizando o mesmo protocolo experimental, confirmaram que as modificações na composição do leite materno são responsáveis pelo aumento da massa corporal dos filhotes do grupo DH. Análises realizadas no 11º dia de lactação demonstraram que o leite das progenitoras DH apresentou elevação nos níveis de lactose, triglicerídeos e colesterol, sem alterações na concentração de leptina, sendo que essas diferenças foram mantidas até o final do período de lactação (Franco *et al.*, 2012). Esses achados sugerem que as alterações na composição do leite materno influenciam diretamente a adiposidade precoce dos filhotes expostos à DH das matrizes.

Evidências provenientes de estudos em humanos indicam que a restrição do crescimento fetal durante a fase inicial da gestação pode ser compensada por um crescimento acelerado no último trimestre, de modo que o peso ao nascimento permaneça dentro da faixa normal (Bloise *et al.*, 2014). Entretanto, essa adaptação pode acarretar desfechos metabólicos adversos a longo prazo, como alterações na pressão arterial e disfunção cardiovascular (Eriksson, 2006). Estudos experimentais em roedores corroboram essa hipótese, demonstrando que a ingestão materna de DH está associada à redução no peso das junções feto-placentárias (Mark *et al.*, 2011), o que pode indicar restrição do crescimento fetal, seguida por uma aceleração compensatória do crescimento pós-natal devido ao maior aporte de lipídios pelo leite materno. Dessa forma, embora os filhotes da prole de ratas submetidas à DH não tenham apresentado diferença na massa corporal ao nascimento, é provável que tenham sofrido alguma restrição no crescimento fetal. Com o fornecimento de maiores níveis de lipídeos via leite materno, sua curva de crescimento foi acelerada (Mark *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, os filhotes machos da prole DH exibiram maior acúmulo de TAB em todos os compartimentos avaliados (retroperitoneal, epididimal e inguinal), em

comparação com a prole C aos 21 dias (Tabelas 5, 6 e 7), o que justifica o aumento do peso corporal observado. Este achado é consistente com estudos anteriores que associam o consumo materno de DH ao desenvolvimento precoce do aumento da adiposidade na prole, independentemente da obesidade materna (Franco *et al.*, 2012; Samuelsson *et al.*, 2013b; Sun *et al.* 2012).

O TAB exerce um papel fundamental no metabolismo energético, sendo os adipócitos responsáveis pela secreção de leptina, uma adipocina essencial na regulação do apetite e do gasto energético (Habbout *et al.*, 2013; Pereira-Toste *et al.*, 2009). A distribuição do tecido adiposo e suas funções metabólicas variam conforme o sexo e fatores genéticos. Além disso, há maior produção de leptina no tecido adiposo subcutâneo, enquanto a lipólise é mais intensa nos depósitos viscerais, resultando em maior mobilização de ácidos graxos (Fonseca-Alanis *et al.*, 2006). Em nossa pesquisa, a prole DH apresentou aumento de 62% na concentração sérica de leptina em comparação a prole C, aos 21 dias (Tabela 9). A hiperleptinemia observada na prole DH, reforça a sua correlação positiva com a adiposidade, uma vez que a leptina, produzida pelo TAB, tem concentração sérica proporcional à adiposidade. Esses achados indicam que o aumento da leptina circulante pode estar diretamente associado à DH das matrizes. O excesso de peso e a hiperleptinemia observados no desmame podem estar relacionados à composição do leite das progenitoras (Bringhenti *et al.*, 2013; Franco *et al.*, 2012; Samuelsson *et al.*, 2013b).

A influência da DH das progenitoras na massa cardíaca da prole também foi avaliada. Os filhotes machos da prole DH apresentaram aumento no peso relativo do coração e nos ventrículos em relação aos machos da prole C (Tabela 8). Esses achados sugerem que a DH das matrizes pode ter induzido hipertrofia cardíaca no modelo experimental utilizado. Esses dados corroboram estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa que observou, através de análise histológica, o aumento no diâmetro dos cardiomiócitos ventriculares sem deposição de colágeno aos 21 dias de idade na prole DH (Rangel, 2022).

A hiperleptinemia é um fator relevante que afeta o funcionamento de diversos órgãos e contribui para o desenvolvimento de DCVs (Zhao; Kusminski; Scherer, 2021). Evidências indicam que o coração é capaz de produzir leptina e expressar pelo menos três isoformas do receptor ObR, sugerindo possível efeito parácrino e autócrino nos cardiomiócitos (Purdham *et al.*, 2004). Além disso, a ampla distribuição de receptores de leptina (ObR) em células vasculares e cardiomiócitos reforça seu potencial papel na modulação da fisiologia

cardiovascular. Em nosso modelo experimental, a avaliação do conteúdo proteico do receptor ObR no coração da prole aos 21 dias de idade foi realizada através da técnica de *Western Blotting*, e não revelou diferenças significativas entre as proles DH e C (Figura 12). Esses achados sugerem que a DH das matrizes não promoveu alterações na expressão proteica do receptor ObR no coração da prole jovem.

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa usando o mesmo modelo experimental foi observado que a prole já na fase inicial da vida, aos 30 dias de idade, apresentaram comprometimento da função cardíaca. O consumo materno de DH promoveu redução na fração de ejeção e do débito sistólico, e hipertrofia nos animais machos da prole. Essas alterações não foram acompanhadas por mudanças na frequência cardíaca, na condução elétrica, no tônus simpático cardíaco ou na pressão arterial na prole DH (Zeca, 2015).

No presente estudo, após o desmame, os filhotes foram alimentados com uma dieta normolipídica até a idade adulta, aos 180 dias. A prole DH apresentou aumento no peso corporal aos 180 dias (Figura 13). Da mesma forma, foram pesados os tecidos adiposos brancos viscerais (retroperitoneal e epididimal) e subcutâneo (inguinal) para avaliar se o consumo de DH pelas progenitoras influenciou a adiposidade na prole adulta. A prole DH apresentou aumento na adiposidade em todos os compartimentos analisados, em comparação ao controle (Figuras 14, 15 e 16), o que justifica o aumento no peso corporal. Esses achados sugerem que a DH das matrizes levou ao aumento da adiposidade nos machos da prole DH na idade adulta.

Trabalhos apontam que a obesidade das matrizes induzida por DH, antes e durante a gestação e lactação, pode programar a elevação da adiposidade na prole, independentemente da dieta pós-natal (Loche *et al.*, 2018; Howie *et al.*, 2009). Outros modelos de programação metabólica demonstraram que a DH das progenitoras leva ao aumento da adiposidade e hiperleptinemia, acompanhados por resistência central ao efeito anorexígeno da leptina (Franco *et al.*, 2012) e hiperfagia na prole jovem de roedores (Samuelsson *et al.*, 2013b).

O hábito alimentar inadequado já foi associado ao aumento significativo no risco de mortalidade por DCVs, frequentemente acompanhado por remodelamento e fibrose cardíaca. Dentro desse contexto, diversos estudos têm correlacionado a alimentação das progenitoras com o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca em seus descendentes (Fernandez-Twinn *et al.* 2012; Fukui *et al.*, 2017; Noeman; Hamooda; Baalash, 2011).

Em nosso experimento, a análise do peso relativo do coração, átrios e ventrículos mostrou que os animais do grupo DH não apresentaram este parâmetro significativamente mais elevado em comparação aos do grupo C (Tabela 10). Esses dados indicam que, aos 180 dias, a programação metabólica induzida pela DH materna não se traduziu em hipertrofia cardíaca detectável por esse parâmetro. O aumento do peso relativo do coração da prole DH observada aos 21 dias (Tabela 8), não foi mantido na fase adulta. Esse achado na fase jovem é respaldado por estudos anteriores do nosso grupo, que demonstraram, por meio de análise histológica, o aumento no diâmetro dos cardiomiócitos ventriculares, sem deposição de colágeno, aos 21 dias de idade (RANGEL, 2022). Contudo, apesar da ausência de diferença significativa no peso relativo do coração aos 180 dias, estudos prévios da nossa equipe demonstraram a ocorrência de hipertrofia excêntrica na prole DH, caracterizada por aumento da massa ventricular e espessamento da parede ventricular, evidenciado por análises do tamanho da câmara cardíaca e dos cardiomiócitos. Esses achados indicam a presença de remodelamento cardíaco, sinalizando que houve um *imprinting* metabólico com repercussões deletérias a longo prazo. Uma das possíveis causas para esse quadro é a alteração do equilíbrio redox, observada nas análises da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas proles C e DH aos 180 dias de vida (Figura 20).

Fernandez-Twinn e colaboradores (2012), relataram que o consumo de uma dieta rica em açúcar e gordura pelas progenitoras resultou no aumento da massa cardíaca em camundongos machos na oitava semana pós-natal. Além disso, análises morfológicas de outros estudos demonstram que a ingestão de DH pelas matrizes pode induzir hipertrofia ventricular esquerda ao desmame, sendo essa alteração estrutural cardíaca capaz de persistir até a fase jovem da prole de roedores, independentemente do peso corporal (Blackmore *et al.*, 2014; Samuelsson *et al.*, 2008).

Em estudo do nosso grupo de pesquisa conduzido por Rangel (2022), a função cardíaca das proles foi avaliada aos 180 dias por ecocardiografia e pela técnica do coração isolado (Langendorff). Ambos os sexos da prole DH apresentaram disfunção sistólica, caracterizada por redução da fração de ejeção e do débito sistólico. Nos machos, observaram-se ainda modificações estruturais cardíacas e maior resposta ao estímulo adrenérgico.

Em nossa pesquisa, aos 180 dias de idade, os níveis séricos de leptina nos animais do grupo DH estavam cerca de cinco vezes superiores aos do grupo C. Portanto, tanto aos 21

quanto aos 180 dias, a prole DH apresentou hiperleptinemia em comparação à prole C (Tabelas 9 e 11).

A hiperleptinemia, conforme já visto anteriormente, desempenha um papel significativo no remodelamento cardíaco, caracterizado por alterações fenotípicas nos cardiomócitos e na MEC, frequentemente resultando em fibrose cardíaca (Habbout *et al.* 2013; Fukui *et al.*, 2017). Estudos indicam que a leptina sintetizada no coração pode estar envolvida em alterações cardíacas associadas à obesidade, induzindo a produção de colágeno por meio do aumento do estresse oxidativo mediado pela ativação da via mTOR, via de sinalização que está associada à regulação da proliferação celular, e com participação da galectina-3 (biomarcador que modula diversos processos fisiológicos que contribuem para a inflamação, fibrose e insuficiência cardíaca). A elevação dos níveis de estresse oxidativo desencadeada por altas concentrações de leptina pode comprometer a contratilidade dos cardiomócitos, um efeito possivelmente relacionado ao aumento da atividade das óxido nítrico sintases (NOS), que são enzimas que catalisam a produção de NO (Martínez-Martínez *et al.*, 2014).

Nossos resultados demonstram que a DH consumida pelas matrizes induziu na prole jovem e adulta um estado de hiperleptinemia aos 21 e 180 dias (Tabelas 9 e 11). A sinalização da via da leptina ocorre predominantemente através do receptor ObR, cuja ativação desencadeia a via JAK-2/STAT-3, modulando processos celulares como proliferação, hipertrofia e remodelamento cardíaco (Purdham *et al.*, 2004). Nossos resultados demonstraram que, aos 21 dias de idade, não houve diferença significativa na expressão do receptor ObR entre as proles DH e C (Figura 12). Entretanto, na fase adulta (180 dias), a expressão de ObR no coração da prole DH estava significativamente maior do que no grupo controle (Figura 17).

Em nosso estudo, aos 180 dias de idade, a análise da expressão proteica dos componentes da via JAK-2/STAT-3 revelou aumento na expressão desses elementos na prole DH em comparação à prole controle. Foi observado aumento significativo da expressão de JAK-2 (Figura 18), assim como da proteína STAT-3 (Figura 19), mas não da sua isoforma fosforilada STAT-3p (Figura 20). A hiperativação dessa via pode estar associada ao remodelamento cardíaco e às alterações na função cardíaca previamente descritas em proles de progenitoras submetidas a DH (Zeca, 2015; Rangel, 2022; Samuelsson *et al.*, 2008; Blackmore *et al.*, 2014).

A proteína SOCS-3, que possui função inibitória na via JAK-2/STAT-3, apresentou redução expressiva na prole DH aos 180 dias (Figura 21). Como a SOCS-3 atua por feedback negativo intracelular, inibindo a fosforilação de JAK-2 e STAT-3, sua redução sugere menor capacidade regulatória dessa via na prole DH, potencialmente levando a um estado de ativação persistente da sinalização da leptina (Sahu, 2004; Zhao; Kiminski; Scherer, 2021). Essa desregulação pode estar envolvida no desenvolvimento de alterações estruturais e funcionais do coração observadas em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Rangel, 2022).

*Sun et al.* (2012), demonstraram que a exposição pós-natal (durante a lactação) à DH das matrizes teve maior impacto na programação metabólica da prole em comparação com a exposição intrauterina, induzindo hiperleptinemia e resistência à leptina já nos primeiros dias de vida. Os filhotes expostos à DH apenas durante a lactação apresentaram aumento precoce de peso, maior adiposidade e redução da ativação do STAT3 em resposta à leptina no núcleo arqueado do hipotálamo aos 10 e 21 dias, evidenciando resistência ao hormônio. Após o desmame, machos do grupo DH pós-natal desenvolveram hiperfagia, prejuízo na tolerância à glicose e mantiveram um peso corporal superior ao da prole exposta à dieta padrão.

Estudos sugerem que a leptina pode ser produzida localmente no coração e atuar por mecanismos autócrinos e parácrinos, modulando a homeostase cardíaca e contribuindo para alterações estruturais em condições de obesidade e hiperleptinemia (Purdham *et al.*, 2004). Nossos estudos demonstraram que não há diferença significativa na expressão cardíaca do RNAm para leptina entre as proles C e DH aos 180 dias (Figura 22).

A hiperleptinemia também está associada ao estresse oxidativo sistêmico e intrarrenal, reduzindo a biodisponibilidade de NO, estimulando a reabsorção de sódio e diminuindo a vasodilatação dependente do endotélio. Além disso, potencializa os efeitos da angiotensina II sobre a PA, contribuindo para a fisiopatologia da hipertensão arterial (Wang *et al.*, 2010).

O equilíbrio redox é essencial para a homeostase celular e a manutenção da função cardiovascular. No entanto, a exposição a DH das progenitoras tem sido associada ao aumento do estresse oxidativo na prole, favorecendo alterações na bioenergética celular e contribuindo para o desenvolvimento de disfunções cardíacas (Habbout *et al.*, 2013; Noeman; Hamooda; Baalash, 2011; Tain; Hsu, 2022).

Nossos resultados demonstraram que a prole DH apresentou maior produção cardíaca de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 180 dias de idade, sugerindo um desbalanço redox através de um estado pró-oxidativo (Figura 23). O aumento da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no coração pode estar associado a uma ativação exacerbada de vias pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial, mecanismos já descritos em condições de estresse oxidativo induzido por DH (Blackmore *et al.*, 2014; Samuelsson *et al.*, 2008).

Estudos demonstram que o excesso de EROs, incluindo o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, pode promover a ativação da via JAK2-STAT3, impactando diretamente a sinalização intracelular da leptina e contribuindo para remodelamento cardíaco e disfunção sistólica (Sun *et al.*, 2012; Purdham *et al.*, 2004). Fernandez-Twinn *et al.* (2012) demonstraram que a exposição intrauterina e durante a lactação a uma dieta obesogênica levou a alterações estruturais no coração da prole, incluindo hipertrofia cardíaca e remodelamento ventricular. Essas mudanças foram acompanhadas por aumento na ativação de vias intracelulares associadas ao crescimento celular, contribuindo para um fenótipo pró-hipertrófico e disfuncional. No nível molecular, os autores identificaram um estado de estresse oxidativo acentuado na prole, evidenciado pelo aumento da expressão de componente da NADPH oxidase, e pela redução da superóxido dismutase de manganês (MnSOD), uma enzima antioxidante essencial. Esse desequilíbrio redox foi corroborado pela elevação de marcadores de peroxidação lipídica, sugerindo um ambiente intracelular pró-oxidativo que pode predispor ao comprometimento da função cardíaca.

Dessa forma, nossos dados sugerem que a DH materna pode promover um estado de estresse oxidativo na prole adulta, refletido pelo aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no tecido cardíaco. Esse desequilíbrio redox pode atuar como um fator-chave na ativação desregulada da via da leptina e na progressão de disfunções cardíacas.

## 7 CONCLUSÕES

Os resultados do nosso estudo indicam que o consumo de DH pelas matrizes durante a gestação e lactação, que são períodos críticos do desenvolvimento, pode promover na prole disfunções metabólicas e cardiovasculares ao desmame e na fase adulta. Este insulto nutricional ocorrido em janelas críticas para a programação metabólica promoveu, aos 21 dias, aumento do peso corporal, da adiposidade em todos os compartimentos avaliados (retroperitoneal, epididimal e inguinal), o que justifica o aumento de peso corporal, e hiperleptinemia nos machos da prole DH. Observamos também, aumento no peso relativo do coração e ventrículos em comparação aos machos da prole C. A expressão proteica cardíaca de ObR não revelou diferenças significativas entre as proles DH e C aos 21 dias.

Após o desmame as proles somente receberam dieta normolipídica até a idade adulta, aos 180 dias. Verificamos na prole DH, aos 180 dias, maior peso corporal, adiposidade e hiperleptinemia em comparação ao controle. Não houve diferença estatística no peso relativo do coração, átrios e ventrículos. Constatamos aumento na expressão proteica cardíaca de ObR, JAK-2, STAT3, mas não da sua isoforma fosforilada STAT-3p, redução da expressão de SOCS-3, um inibidor dessa via, e não houve diferença significativa na expressão cardíaca do RNAm para leptina entre as proles C e DH, aos 180 dias. Esses achados podem estar relacionados com as alterações funcionais observadas anteriormente em nosso grupo, que demonstraram disfunção sistólica na prole DH aos 180 dias, com remodelamento cardíaco mais evidente nos machos.

Além disso, verificamos aumento da produção cardíaca de  $H_2O_2$  na prole DH adulta, indicando desequilíbrio redox, podendo estar associado a uma ativação exacerbada de vias pró-inflamatórias e disfunção mitocondrial, mecanismos já descritos em condições de estresse oxidativo induzido por dietas hiperlipídicas. O estresse oxidativo elevado pode impactar diretamente a sinalização da leptina, ativando a via JAK2-STAT3 e contribuir no remodelamento cardíaco e disfunção sistólica. Desta forma, nossos resultados indicam que a dieta hiperlipídica materna pode ter programado a prole adulta para maior adiposidade, a hiperleptinemia, que associada ao aumento do estresse oxidativo, pode causar disfunção na via de sinalização da leptina, aumentando a expressão proteica cardíaca de ObR, JAK-2, STAT-3, reduzindo SOCS-3, sem diferença significativa na expressão de RNAm para leptina no coração na prole DH adulta. Em conjunto, estes podem ser fatores determinantes na

programação de disfunções metabólicas e cardiovasculares na prole exposta à dieta hiperlipídica das progenitoras.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, A.; LIANG, M.; CHI, L.; ZHOU, Y.Q.; SLED, J.G.; WILSON, M.D.; DELGADO-OLGUÍN, P. Maternal obesity persistently alters cardiac progenitor gene expression and programs adult-onset heart disease susceptibility. **Mol Metab.** 2021 Jan;43:101116. DOI: 10.1016/j.molmet.2020.101116. Epub 2020 Nov 17.

BARKER, D. J. P. The developmental origins of adult disease. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 23, n. 6, p. 588S–595S, 2004. Disponível em: [https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15640511/?utm\\_source=chatgpt.com](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15640511/?utm_source=chatgpt.com). Acesso em: 13 dez. 2024.

BARROSO, T. A. *et al.* Association of Central Obesity with The Incidence of Cardiovascular Diseases and Risk Factors. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, Rio de Janeiro, v.30, nº.5, p.416–424, set./out. 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/2359-4802.20170073>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

BARROSO, T. A. *et al.* Association of Central Obesity with The Incidence of Cardiovascular Diseases and Risk Factors. **International Journal of Cardiovascular Sciences**, Rio de Janeiro, v.30, nº.5, p.416–424, set./out. 2017. <https://doi.org/10.5935/2359-4802.20170073>. Disponível em: <<https://doi.org/10.5935/2359-4802.20170073>>. Acesso em: 20 abr. 2023.

BLACKMORE, H.L.; NIU, Y.; FERNANDEZ-TWINN, D.S.; TARRY-ADKINS, J.L.; GIUSSANI, D.A.; OZANNE, S.E. A obesidade induzida pela dieta materna programa a disfunção cardiovascular na prole de camundongos machos adultos, independente do peso corporal atual. **Endocrinologia**. 155(10):3970-3980, 2014.

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.

BLOISE, E.; FEUER, S. K.; RINAUDO, P. F. Comparative intrauterine development and placental function of ART concepti: implications for human reproductive medicine and animal breeding. **Hum Reprod Update**, v. 20, n. 6, p. 822-39, Nov-2014.

BLÜHER, M. Obesity: global epidemiology and pathogenesis. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 15, p. 288–298, Maio 2019. DOI: 10.1038/s41574-019-0176-8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30814686/>. Acesso em: 28 jul. 2024.

BRANDS, M.W.; BANES-BERCELI, A.K.; INSCHO, E.W.; AL-AZAWI, H.; ALLEN, A.J.; LABAZI, H. Interleukin 6 knockout prevents angiotensin II hypertension: role of renal vasoconstriction and Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 activation. **Hypertension**. 2010 Nov. 56:879– 884. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158071. Epub 2010 Oct 4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20921429/>. Acesso em: 19 set. 2024.

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.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms, and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, 1851(4), 469-484. 2015.

CHEN, W. J.; KELLY, R. B. Effect of prenatal or perinatal nicotine exposure on neonatal thyroid status and offspring growth in rats. **Life Sci.**, n. 76, p. 1249–1258, 2005.

CHU, D.T.; TAO, Y. Human thermogenic adipocytes: a reflection on types of adipocyte, developmental origin, and potential application. **J Physiol Biochem.**, v.73, nº.1, p.1-4, Fev. 2017.

CORDEIRO, A.; DE SOUZA, L.L.; OLIVEIRA, L.S.; FAUSTINO, L.C.; SANTIAGO, L.A.; BLOISE, F.F.; ORTIGA-CARVALHO, T.M.; ALMEIDA, N.A.; PAZOS-MOURA, C.C. Thyroid hormone regulation of Sirtuin 1 expression and implications to integrated responses in fasted mice. **J Endocrinol**. 2013 Jan 18;216(2):181-93. DOI: 10.1530/JOE-12-0420.

COSTA, M.F.; VALLE, J. Síndrome metabólica: prevalência e associação com doenças cardiovasculares. **Demetra: Nutrição e Saúde**, v.7, nº. 2, p.119-132, 2012. DOI: 10.12957/demetra.2012.3598. Disponível em: <<https://www.e-publicacoes.uerj.br/demetra/article/view/3598>>. Acesso em: 23 abr. 2023.

COVASA, M. Deficits in gastrointestinal responses controlling food intake and body weight. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 299, n. 6, p. 1423–39, 2010.

CRUJEIRAS, A.B.; CARREIRA, M.C.; CABIA, B.; ANDRADE, S.; AMIL, M.; CASANUEVA, F.F. Leptin resistance in obesity: An epigenetic landscape. **Life Sci.** Nov 1;140:57-63. 2015. DOI: 10.1016/j.lfs.2015.05.003. Epub 2015 May 18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25998029/>. Acesso em: 20 ago. 2024.

DESAI, M.; JELLYMAN, J. K.; HAN, G, M.; LANE, R. H.; ROSS, M. G. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. **Am J Obstet Gynecol**, v. 211, p. 237.e1-237.e13, Set-2014.

EICKEMBERG, M.; AMORIM, L.D.A.F; ALMEIDA, M.C.C; PITANGA, F.J.G; AQUINO, E.M.L; FONSECA, M.J.M.; MATOS, S.M.A. Obesidade abdominal no ELSA-Brasil: construção de padrão-ouro latente e avaliação da acurácia de indicadores diagnósticos. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.25, nº.8, p.2985-2998, Ago. 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1413-81232020258.20992018>>. Acesso em: 20 set. 2023.

ENERBÄCK, S. Adipose tissue plasticity and new therapeutic targets. **Nat Rev Endocrinol**. v.9, p.69–70, 2013. DOI <https://doi.org/10.1038/nrendo.2012.242>. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrendo.2012.242>>. Acesso em: 18 set. 2023.

ERIKSSON, J. G. Early growth, and coronary heart disease and type 2 diabetes: experiences from the Helsinki Birth Cohort Studies. **Int J Obes (Lond)**, v. 30, s. 4, p. S18– S22, 2006.

FASSHAUER ,M.; BLÜHER, M. Adipokines in health and disease. **Trends Pharmacol Sci**. 2015 Jul;36(7):461-70. DOI: 10.1016/j.tips.2015.04.014. Epub 2015 May 25. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26022934/>. Acesso em: 12 jul. 2024.

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.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I. C.; LIMA, F. B. O Tecido Adiposo Como Centro Regulador do Metabolismo. **Arq Bras Endocrinol Metab**; v.50, n.2, p.216-229, 2006.

FRAGA-MARQUES, M.C.; MOURA, E.G.; CLAUDIO-NETO, S.; TREVENZOLI, I.H.; TOSTE, F.P.; PASSOS, M.C.; LISBOA, P.C.; MANHÃES, A.C. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. **Horm Behav**, 55: 272-279; 2009.

FRAGA-MARQUES, M.C.; MOURA, E.G.; CLAUDIO-NETO, S.; TREVENZOLI, I.H.; TOSTE, F.P.; PASSOS, M.C.; LISBOA, P.C.; MANHAES, A.C. Neonatal hyperleptinaemia programmes anxiety-like and novelty seeking behaviours but not memory/learning in adult rats. **Horm Behav**, 55: 272-279; 2009.

FRANCO, J.G.; FERNANDES, T.P.; ROCHA, C.P. et al. Dieta materna rica em gordura induz obesidade e disfunção adrenal e tireoidiana em filhotes de ratos machos ao desmame. **J Fisiol**. 590(21):5503-5518. 2012.

FRANCO, J. G.; FERNANDES, T. P.; ROCHA, C. P. D.; CALVIÑO, C.; PAZOSMOURA, 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. **J Physiol**, v. 590, n.21, p. 5503–5518, 2012.

FU, J.; HOFKER, M.; WIJEMENGA, C. Apple or Pear: Size and Shape Matter, **Cell Metabolism**, v. 21, nº.4, p.507-508, 2015. DOI: 10.1016/j.cmet.2015.03.016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25863240/>. Acesso em: 17 fev. 2

FUKUI, A.; IKEBE-EBATA, Y.; KONDO, H.; SAITO, S.; AOKI, K.; FUKUNAGA, N.; SHINOHARA, T.; MASAKI, T.; TESHIMA, Y.; TAKAHASHI, N. Hyperleptinemia Exacerbates High-Fat Diet-Mediated Atrial Fibrosis and Fibrillation. **J Cardiovasc Electrophysiol**. 2017 Jun;28(6):702-710. doi: 10.1111/jce.13200. Epub 2017 May 2.

GHABEN, A.L.; SCHERER, P.E. Adipogenesis and metabolic health. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2019 Apr;20(4):242-258. DOI: 10.1038/s41580-018-0093-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30610207/>. Acesso em: 24 jul 2024.

GLUCKMAN, P.D.; HANSON, M.A.; BUKLIJAS, T. A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. **J Dev Orig Health Dis**. Feb;1(1):6–18. 2010.

GRAY, C.; VICKERS, M.H.; SEGOVIA, S.A.; ZHANG, X.D.; REYNOLDS, C.M. A maternal high fat diet programmes endothelial function and cardiovascular status in adult male offspring independent of body weight, which is reversed by maternal conjugated linoleic acid (CLA) supplementation. **PLoS One**. 2015 Feb 19;10(2):e0115994. DOI: 10.1371/journal.pone.0115994. Erratum in: PLoS One. 2015 Sep 25;10(9):e0139567.

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.** 2013 Sep;209(3):262.e1-8. DOI: 10.1016/j.ajog.2013.05.023. Epub 2013 Jun 4.

HABBOUT, A.; GUENANCIA, C.; LORIN, J.; RIGAL, E.; FASSOT, C.; ROCHEINTE, L.; VERGELY, C. Postnatal Overfeeding Causes Early Shifts in Gene Expression in the Heart and Long-Term Alterations in Cardiometabolic and Oxidative Parameters. **PLoS ONE** 8(2): e56981. DOI:10.1371/journal.pone.0056981; 2013. Disponível em: Acesso em: 30 nov. 2024.

HILL, M.A.; YANG, Y.; ZHANG, L.; SUN, Z.; JIA, G.; PARRISH, A.R.; SOWERS, J.R. Insulin resistance, cardiovascular stiffening and cardiovascular disease. **Metabolism.** 2021 Jun. 119:154766. DOI: 10.1016/j.metabol.2021.154766. Epub 2021 Mar 22. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33766485/>. Acesso em 15 ago. 2024.

HOWIE, G.J.; SLOBODA, D.M.; KAMAL, T.; VICKERS, M.H. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. **J Physiol.** 2009 Feb 15;587(Pt 4):905-15. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.163477. Epub 2008 Dec 22.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Atenção primária à saúde e informações antropométricas: Brasil / IBGE**, Coordenação de Trabalho e Rendimento. Rio de Janeiro: IBGE, 2020. 66p. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101758.pdf>. Acesso em 27 out. 2024.

JANUS, A.; SZAHIDEWICZ-KRUPSKA, E.; MAZUR, G.; DOROSZKO, A. Insulin Resistance and Endothelial Dysfunction Constitute a Common Therapeutic Target in Cardiometabolic Disorders. **Mediators Inflamm.** 2016. 3634948. DOI: 10.1155/2016/3634948. Epub 2016 Jun 20. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4931075/>. Acesso em 18 ago. 2024.

JUNG, C. H.; KIM, M. Molecular mechanisms of central leptin resistance in obesity. **Arch Pharm Res**, v. 36, p. 201-7, 2013.

KIRK, S. L.; SAMUELSSON, A-M.; ARGENTON, M.; DHONYE, H.; KALAMATIANOS, T.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D.; COEN, C. W. Maternal Obesity Induced by Diet in Rats Permanently Influences Central Processes Regulating Food Intake in Offspring. **PLoS ONE**, v. 4, n. 6, p. e5870, 2009.

LEE, D.L.; STURGIS, L.C.; LABAZI, H.; OSBORNE, J.B. JR.; FLEMING, C.; POLLOCK, J.S.; MANHIANI, M.; IMIG, J.D.; BRANDS, M.W. Angiotensin II hypertension is attenuated in interleukin-6 knockout mice. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2006 Mar. 290(3):H935-40. DOI: 10.1152/ajpheart.00708.2005. Epub 2005 Nov 11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16284237/>. Acesso em 13 Set. 2024.

LI, G.; KOHORST, J. J.; ZHANG, W.; LARITSKY, E.; KUNDE-RAMAMOORTHY, G.; BAKER, M. S.; FIOROTTO, M. L.; WATERLAND, R. A. Early postnatal nutrition determines adult physical activity and energy expenditure in female mice. **Diabetes** 62, 2773-2783. Epub 2013 Apr 1. <https://doi.org/10.2337/db12-1306>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23545705/>. Acesso em 15 dez. 2024.

LIMA, F. B.; CURI, R. Moléculas ativas produzidas por órgãos não endócrinos. In: Fisiologia. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2012.

LISBOA, P.C. A amamentação molda o resto da nossa vida (livro eletrônico): doenças que surgem com o desenvolvimento. Patrícia C. Lisboa, Egberto G. Moura, - Mogi Guaçu, SP: Bracelete, 2023. 343p.

LOCHE, E.; BLACKMORE, H.L.; CARPENTER, A.A.; BEESON, J.H.; PINNOCK, A.; ASHMORE, T.J.; AIKEN, C.E.; DE 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. *Cardiovasc Res.* Aug 1;114(10):1372-1384. 2018.

MANDY, M.; NYIREND, M. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. *Int Health.* 2018 Mar 1;10(2):66-70. DOI: 10.1093/inthealth/ihy006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29528398/>. Acesso em 7 dez. 2024.

MARK P. J.; SISALA, C.; CONNOR, K.; PATELA, R.; LEWISA1, J. L.; VICKERS, M. H.; WADDELL, B. J.; SLOBODA, D. M. A maternal high-fat diet in rat pregnancy reduces growth of the fetus and the placental junctional zone, but not placental labyrinth zone growth. *Journal of the Developmental Origins of Health and Disease*, v. 2, p. 63–70, 2011.

MAROUSEZ, L., LESAGE, J., EBERLE, D., 2019. Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming? *Nutrients* 11, no. 12: 2966. DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11122966>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31817318/>. Acesso em: 5 jan. 2025.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, E.; JURADO-LÓPEZ, R.; VALERO-MUNÓZ, M.; BARTOLOMÉ, M. V.; BALLESTEROS, S.; LUACES, M.; BRIONES, A. M.; LÓPEZANDRÉS, 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, Mai-2014. doi: 10.1097/HJH.0000000000000149.

MYERS, M. G.; HEYMSFIELD, S. B.; HAFT, C.; KAHN, B. B.; LAUGHLIN, M.; LEIBEL, R. L.; TSCHÖP, M. H.; YANOVSKI, J. A. Challenges and opportunities of defining clinical leptin resistance. *Cell Metab*, v. 15, p. 150-6, 2012.

NAPSO, T.; LEAN, S.C.; LU, M.; MORT, E.J.; DESFORGES, M.; MOGHIMI, A.; BARTELS, B.; EL-BACHA, T.; FOWDEN, A.L.; CAMM, E.J.; SFERRUZZI-PERRI, A.N. Diet-induced maternal obesity impacts feto-placental growth and induces sex-specific alterations in placental morphology, mitochondrial bioenergetics, dynamics, lipid metabolism and oxidative stress in mice. *Acta Physiol (Oxf)*. 2022 Apr;234(4):e13795. DOI: 10.1111/apha.13795. Epub 2022 Feb 15. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35114078/>. Acesso em: 10 jan. 2025.

NOEMAN, S.A.; HAMOODA, H.E.; BAALASH, A.A. Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetol Metab Syndr* 3, 17 (2011). DOI: <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-17>

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Noncommunicable diseases progress monitor 2022. Geneva: **World Health Organization**, 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047761>. Acesso em 29 jul. 2024.

ORMAZABAL, V.; NAIR, S.; ELFEKY, O.; AGUAYO, C.; SALOMON, C.; ZUÑIGA, F.A. Association between insulin resistance and the development of cardiovascular disease. **Cardiovasc Diabetol.** 2018 Aug 31;17(1):122. DOI: 10.1186/s12933-018-0762-4. Disponível em: <https://PMC6119242/>. Acesso em: 15 ago. 2024.

PEREIRA-TOSTE, F.; TOSTE, F.P.; OLIVEIRA, E.; TROTTA, P.A.; LISBOA, P.C.; MOURA, E.G.; PASSOS, M.C. Early Maternal Hyperleptinemia Programs Adipogenic Phenotype in Rats. **Horm Metab Res.** 14; 2009.

PONCHEL, F.; TOOMES, C.; BRANSFIELD, K.; LEONG, F.T.; DOUGLAS, S.H.; FIELD, S.L.; BELL, S.M.; COMBARET, V.; PUISIEUX, A.; MIGHELL, A.J.; ROBINSON, P.A.; INGLEHEARN, C.F.; ISAACS, J.D.; MARKHAM, A.F. Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: an alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. **BMC Biotechnol.** 2003 Oct 13;3:18. DOI: 10.1186/1472-6750-3-18. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14552656/>. Acesso em: 14 ago. 2024.

PUCHE-JUAREZ, M.; TOLEDANO, J.M.; OCHOA, J.J.; DIAZ-CASTRO, J.; MORENO-FERNANDEZ, J. Influence of Adipose Tissue on Early Metabolic Programming: Conditioning Factors and Early Screening. **Diagnostics**, v. 13, n. 9, p. 1510, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics13091510>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37174902/>. Acesso em: 13 ago. 2024.

PURDHAM, D.M.; ZOU M.X.; RAJAPUROHITAM, V.; KARMAZYN, M. Rat heart is a site of leptin production and action. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2004 Dec;287(6):H2877-84. DOI: 10.1152/ajpheart.00499.2004. Epub 2004 Jul 29. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15284063/>. Acesso em: 14 nov. 2024.

RANGEL, N.A.L. Avaliação do efeito do consumo materno de dieta hiperlipídica sobre a função cardíaca da prole adulta de ratos. 2022. **Tese** (Doutorado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, 2022.

ROBERTS, C.K.; SINDHU, K.K. Oxidative stress and metabolic syndrome. **Life Sci.** 2009 May 22;84(21-22):705-12. DOI: 10.1016/j.lfs.2009.02.026. Epub 2009 Mar 9.

RODRÍGUEZ, A.; EZQUERRO, S.; MÉNDEZ-GIMÉNEZ, L.; BECERRIL, S.; FRÜHBECK, G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** 2015 Oct 15;309(8):E691-714. DOI: 10.1152/ajpendo.00297.2015. Epub 2015 Sep 1. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26330344/>. Acesso em: 10 fev. 2023.

ROSEN, E.D.; SPIEGELMAN, B.M. What we talk about when we talk about fat. **Cell.** Jan 16;V.156, n°.1-2, p.20-44, Jan. 2014. DOI: 10.1016/j.cell.2013.12.012. Disponível em: <<https://www.cell.com/fulltext/S0092-86741301546-8>>. Acesso em: 17 Ago. 2023.

RUBIO-RUÍZ, M. E.; DEL VALLE-MONDRAGÓN, L.; CASTREJÓN-TELLEZ, V.; CARREÓN-TORRES, E.; DÍAZ-DÍAZ, E.; GUARNER-LANS, V. Angiotensin II and 1-7 during aging in Metabolic Syndrome rats. Expression of AT1, AT2 and Mas receptors in abdominal white adipose tissue. **Peptides**, v. 57, p. 101-8, Jul-2014. DOI: 10.1016/j.peptides.2014.04.021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24819472/>. Acesso em: 12 set. 2024.

SAHU, A. Minireview: A hypothalamic role in energy balance with special emphasis on leptin. **Endocrinology**. 2004 Jun;145(6):2613-20. DOI: 10.1210/en.2004-0032. Epub 2004 Mar 24. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15044360/>. Acesso em: 28 nov. 2024.

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.; MATTHEWS, P. A.; JANSEN, E.; TAYLOR, P. D.; POSTON, L. Sucrose feeding in mouse pregnancy leads to hypertension, and sex-linked obesity and insulin resistance in female offspring. **Front Physiol.**, v. 4, p. 14, Fev-2013a.

SAMUELSSON, A.M.; CLARK, J.; RUDYK, O.; SHATTOCK, M. J.; BAEA, S. E.; SOUTH, T.; POMBO, J.; REDINGTON, K.; UPPAL, E.; COEN, C. W.; POSTON, L.; TAYLOR, P. D. Experimental Hyperleptinemia in neonatal rats leads to selective leptin responsiveness, hypertension and altered myocardial function. **Hypertension**, v. 62, p. 627–633, 2013b.

SANCHEZ-GURMACHES, J.; GUERTIN, D.A. Adipocyte lineages: tracing back the origins of fat. **Biochim Biophys Acta**. 2014 Mar;1842(3):340-51. DOI: 10.1016/j.bbadic.2013.05.027. Epub 2013 Jun 4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23747579/>. Acesso em: 10 out. 2024.

SCHEIDL, T.B.; BRIGHTWELL, A.L.; EASSON, S.H.; THOMPSON, J.A. Maternal obesity and programming of metabolic syndrome in the offspring: searching for mechanisms in the adipocyte progenitor pool. **BMC Med.** 2023. Feb 13;21(1):50. DOI: 10.1186/s12916-023-02730-z. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36782211/>. Acesso em 19/2/2024.

SCHUMACHER, R., ROSSETTI, M. F., LAZZARINO, G. P., CANESINI, G., GARCIA, A. P., STOKER, C., ANDREOLI, M. F., RAMOS, J. G. Temporary effects of neonatal overfeeding on homeostatic control of food intake involve alterations in POMC promoter methylation in male rats. **Mol Cell Endocrinol** 522, 111123. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.111123>

SIES, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v. 11, p. 613–619, 2017. Disponível em: [https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4309861/?utm\\_source=chatgpt.com](https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4309861/?utm_source=chatgpt.com). Acesso em 7 dez. 2024.

SIMONDS, S.E.; PRYOR, J.T.; RAVUSSIN, E.; GREENWAY, F.L.; DILEONE, R.; ALLEN, A.M.; BASSI, J.; ELMQUIST, J.K.; KEOGH, J.M.; HENNING, E.; MYERS, M.G. JR., LICINIO, J.; BROWN, R.D.; ENRIORI, P.J.; O'RAHILLY, S.; STERNSON, S.M.; GROVE, K.L.; SPANSWICK, D.C.; FAROOQI, I.S.; COWLEY, M.A. Leptin mediates the increase in blood pressure associated with obesity. **Cell**. 2014 Dec 4;159(6):1404-16. DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.058. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25480301/>. Acesso em: 27 nov. 2024.

SUN, B.; PURCELL, R.H.; TERRILLION, C.E.; YAN, J.; MORAN, T.H.; TAMASHIRO, K.L. Maternal high- fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. **Diabetes**. 2012 Nov;61(11):2833-41. DOI: 10.2337/db11-0957.

TAIN, Y-L.; HSU, C-N. Maternal High-Fat Diet and Offspring Hypertension. **International Journal of Molecular Sciences**. 2022; 23(15):8179. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23158179>

TOSTE, F.P.; ALVES, S.B.; DUTRA, S.C.; BONOMO, I.T.; LISBOA, P.C.; MOURA, E.G.; PASSOS, M.C.. Temporal evaluation of the thyroid function of rats programed by leptin treatment on the neonatal period. **Horm Metab Res** 38: 827-831; 2006a.

TOSTE, F.P.; DE MOURA, E.G.; LISBOA, P.C.; FAGUNDES, A.T.; DE OLIVEIRA, E.; PASSOS, M.C. Neonatal leptin treatment programmes leptin hypothalamic resistance and intermediary metabolic parameters in adult rats. **Br J Nutr** 95: 830-7; 2006b.

TRANDAFIR, L.M.; DODI, G.; FRASINARIU, O.; LUCA, A.C.; BUTNARIU, L.I.; TARCA, E.; MOISA, S.M. Tackling Dyslipidemia in Obesity from a Nanotechnology Perspective. **Nutrients**. 2022 Sep 13;14(18):3774. DOI: 10.3390/nu14183774. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36145147/> Acesso 27 out. 2024.

TREVENZOLI, I.H.; VALLE, M.M.; MACHADO, F.B.; GARCIA, R.M.; PASSOS, M.C.; LISBOA, P.C.; MOURA E.G. Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. **J Physiol** 580: 629-637; 2007.

UPADHYAY, J.; FARR, O.; PERAKAKIS, N.; GHALY, W.; MANTZOROS, C. Obesity as a Disease. **Med Clin North Am**. 2018 Jan;102(1):13-33. DOI: 10.1016/j.mcna.2017.08.004. Epub 2017 Oct 21. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29156181/>. Acesso em 27 out. 2024.

VITHAYATHIL, M.A.; GUGUSHEFF, JR.; ONG, Z.Y.; LANGLEY-EVANS, S.C.; GIBSON, R.A.; MUHLHAUSLER, B.S. Exposure to maternal cafeteria diets during the suckling period has greater effects on fat deposition and Sterol Regulatory Element Binding Protein-1c (SREBP-1c) gene expression in rodent offspring compared to exposure before birth. **Nutr Metab (Lond)**. 2018 Feb 15;15:17. DOI: 10.1186/s12986-018-0253-3.

WANG, J.; MA, H.; TONG, C.; ZHANG, H.; LAWLIS, G.B.; LI, Y.; ZANG, M.; REN, J.; NIJLAND, M.J.; FORD, S.P.; NATHANIELSZ, P.W.; LI, J. Overnutrition and maternal obesity 89 in sheep pregnancy alter the JNKIRS-1 signaling cascades and cardiac function in the fetal heart. **FASEB J**. 24:2066- 2076. 2010.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Noncommunicable diseases progress monitor 2022. Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047761>. Acesso em 29 dez. 2024.

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, 2011.

ZECA, A.G. Efeito do consumo materno de dieta hiperlipídica sobre a função cardíaca da prole jovem. 2015. **Dissertação** de mestrado em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, 2015.

ZHAO, S.; KUSMINSKI, C.M.; SCHERER, P.E. Adiponectin, Leptin and Cardiovascular Disorders. **Circ Res**. 2021 Jan 8;128(1):136-149. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.120.314458. Epub 2021 Jan 7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33411633/>. Acesso em: 25 nov. 2024.