Flávia Ramos de Siqueira

Restrição no consumo de sódio durante a gestação é responsável pelo baixo peso ao nascimento e pela resistência à insulina da prole na idade adulta : estudo do mecanismo epigenético por metilação do DNA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Nefrologia
Orientador: Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Siqueira, Flávia Ramos de
Restrição no consumo de sódio durante a gestação é responsável pelo baixo peso ao nascimento e pela resistência à insulina da prole na idade adulta : estudo do mecanismo epigenético por metilação do DNA / Flávia Ramos de Siqueira. -- São Paulo, 2014.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Nefrologia.
Orientador: Joel Claudio Heimann.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Dieta hipossódica 3.Programação fetal 4.Baixo peso ao nascer 5.Intolerância à glucose 6.Resistência à insulina 7.Fator de crescimento similar à insulina tipo 1 8.Epigênese genética 9.Metilação do DNA 10.Ilhas de CpG 11.Expressão gênica

USP/FM/DBD-056/14

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Investigação Médica 16 (LIM-16) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e recebeu apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) bolsa de doutorado e bolsa doutorado sanduíche no exterior (8164/12-6) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), auxílio regular (13/00104-0).

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus queridos pais Arnaldo e Teresa, pessoas que amo demais, por toda dedicação, compreensão e incentivo, pelo apoio incondicional em minhas batalhas e conquistas. Devo tudo a vocês.

Agradecimentos especiais

*Ao meu orientador, **Prof. Dr. Joel Claudio Heimann**, embora não se sinta muito bem recebendo elogios, adora e não se cansa de fazê-los. Agradeço pela confiança, paciência, incentivo, apoio incondicional, pela liberdade das brincadeiras, por acreditar e confiar tanto em mim! Muitas vezes acreditou mais em mim do que eu mesma. Obrigada por todas as oportunidades concedidas, por sua total disposição em me auxiliar cordialmente. Muito obrigada pela oportunidade do convívio e por todos os ensinamentos.*

*A minha amiga **Tatiana Martins Aniteli**, pela amizade incondicional e parceria. Pessoa essencial para o desenvolvimento deste trabalho, principalmente pelo lado pessoal, por toda ajuda concedida, pelos conselhos, força, incentivo, carinho, por estar sempre ao meu lado independente das minhas decisões e principalmente por todos os momentos mágicos de descontração e muita alegria. Agradeço por tê-la como AMIGA.*

*À **Deus** por me conceder uma vida repleta de acontecimentos significativos e conquistas ao lado de pessoas maravilhosas.*

Agradecimentos

À Dra Luzia Furukawa pela colaboração e contribuição indispensável desde o início deste trabalho. Pela competência e dedicação na ajuda com os meus experimentos realizados e desenvolvimento deste trabalho. Sou muito grata por tudo o que fez por mim.

À mestre Ivone Braga de Oliveira pelo convívio diário e disposição de ajudar em todos os momentos. Uma das pessoas fundamentais na colaboração deste trabalho e, além disso, uma grande amiga. Obrigada por todos os momentos compartilhados, apoio, incentivo, atenção e carinho.

À Regiane Machado de Souza, pelo carinho, amizade e companhia. Muito obrigada por toda ajuda e por me fazer sorrir nos momentos mais "angustiantes" durante os experimentos. Você faz falta!

À Dra Edna Regina Nakandakare pela disposição em ajudar atenciosamente, pelos esclarecimentos e discussões dos resultados.

Ao Walter Campestre pessoa ímpar no nosso biotério, obrigada pela ajuda e dedicação no cuidado com os animais e principalmente pelo bom humor, conversas, elogios, piadas e abraços apertados.

Ao Prof. Dr. Rui Toledo pela cooperação, incentivo, atenção e eficiência nos assuntos relacionados à pós-graduação e na concessão da bolsa de doutorado sanduíche.

I am grateful to Prof. Lester Kobzik from the Harvard School of Public Health for kindly sharing his laboratory for my teaching and training in the pyrosequencing technique. Thanks also to the post-doctoral student Sunny Nguyen for all the help and his expert technical assistance. I would like to thank Sanjukta Ghosh for the warm welcome, friendship and share with me her knowledge. Thank you also for the warm welcome of Patrice Ayres, Marshall, David, Freeman, Sally, Peng, Christine, Rose, André, Ping and Alan.

Ao Prof. Dr. Mário H. Hirata por abrir as portas do seu laboratório para realização dos experimentos com o uso do pirosequenciador.

À Dra Paula Helena Lima por me receber tão bem no seu laboratório. Pelos conselhos, incentivo, pelas trocas de ideias e companhia nos almoços. Por me permitir conhecer e conviver um pouquinho com pessoas maravilhosas.

Aos novos amigos conquistados do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia durante este trabalho: Jéssica Cassilla, pela amizade e colaboração constante, por arranjar um lugarzinho para minhas amostras e reagentes, pelas caronas e cumplicidade. A Lin, Denise, Aécio, Fabiana e Thiago por todos os momentos prazerosos (ou deliciosos) que passamos juntos.

À mestranda Raquel Cavallari (bruxa) pela amizade, carinho, momentos de alegria, desabafos, choros, conforto. Flor obrigada pela ajuda e abraços nos momentos chaves.

Aos atenciosos e queridos secretários da pós-graduação Pedro Henrique Pereira e Eliana Gonçalves por toda atenção, colaboração e ajuda nos assuntos administrativos da pós-graduação.

As queridas secretárias do Lim-16 Denise Duarte e Solange Coutinho pelo auxílio constante.

Ao querido amigo Wagner Vasques Domínguez pelo apoio, incentivo e pela eficiência que tornou minha vida mais fácil.

Às queridas Dra Luciene Machado, Dra Vanda Jorgetti, pelo agradável convívio, incentivo constante e sábios comentários.

Aos queridos membros do Lim-16: Dra Miriam, Neuziane, Priscila, Ellen, Karen, Juliana, Sônia, Carina, Carolina, Edson, Rafael, Guilherme, Isis, Fabiana, Rackel, Verônica, Rosimeire, Flávia, Simone, Dr Roberto Zatz, Dra Clarice, Claudia, Neto, Camilla, Victor, Ricardo, Janice, Newton pelas trocas de ideias e companheirismo. Obrigada pessoal!

Aos grandes e queridos amigos Camila, Carol, Maria Fernanda, Marcelo e Nicole, essenciais na minha vida, pelas experiências compartilhadas, paciência, motivação e momentos de desabafos. Sou privilegiada por tê-los por perto.

À Mariane Tesch D'avila pela ajuda nos momentos em que mais precisei.

Aos meus queridos tios Silvio e Maria pelo respeito, motivação constante, preocupação e carinho. Eu amo vocês.

Aos meus pais por estarem sempre ao meu lado, por me orientarem e me darem força nos momentos difíceis, pela paciência, carinho e amor. Aos meus irmãos e família, Fabíola, Rogério, Fabiane, Marco, Fernanda, Rodrigo, Arnaldinho e Francine que estão sempre torcendo e vibrando por mim, a motivação, incentivo e força de vocês são essenciais para continuar lutando pelos meus ideais e nunca me deixar desanimar. Aos meus amores, Arthur, João Gabriel e Manoela apesar da pouca idade sabem a hora certa de colocar um sorriso no meu rosto. Muito obrigada por tudo que vocês fizeram e fazem por mim. Eu amo demais todos vocês!

Aos animais que foram eutanasiados para a realização deste estudo. A eles demonstro o meu respeito e seriedade com que esse trabalho foi conduzido.

Às instituições de fomento, CAPES e FAPESP, pelo auxílio financeiro, o qual permitiu o desenvolvimento deste estudo e foram fundamentais para minha formação acadêmica e científica.

A todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Nefrologia, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"I may not have gone where I intended to go, but I think I have ended up where I needed to be."

Douglas Adams

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).*

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

LISTAS DE FIGURAS

LISTAS DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE SÍMBOLOS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVO GERAL 17

2.1 Objetivos específicos 17

3 MÉTODOS 18

3.1 Animais 18

3.2 Protocolo experimental 18

3.3 Medida do peso corpóreo e comprimento naso-anal 21

3.4 Determinações bioquímicas 22

3.4.1 Determinação da insulina, leptina, glicemia, peptídeo-C e IGF-1 22

3.4.2 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (GTT) e teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ITT) 22

3.5 Cálculo do índice de HOMA (*Homeostasis Model Assessment*) 23

3.6 Extração, purificação e integridade do RNA total 23

3.6.1 Síntese do cDNA 24

3.6.2 Desenho e concentração dos oligos (*primers*) 25

3.6.3 Reação de RT-PCR quantitativo 25

3.7 Avaliação da metilação do DNA 27

3.7.1 Extração do DNA genômico (gDNA) 27

3.7.2 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio 27

3.7.3 Desenho dos oligos iniciadores (*primers*) para PCR e Pirosequenciamento 28

3.7.4 PCR pós-tratamento com o bissulfito de sódio 28

3.7.5 Pirosequenciamento 30

3.8 Análise Estatística 35

4. RESULTADO 36
4.1 Grupo Materno 36
4.1.1. Consumo de ração e ingestão hídrica materna 36
4.1.2 Evolução ponderal materna 37
4.1.3 Tamanho da prole 38
4.1.4 Massa dos tecidos adiposos brancos 39
4.1.5 Índice de adiposidade 39
4.1.6 Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal 39
4.2 Grupo Prole 41
4.2.1 Natimortalidade 41
4.2.2 Peso corpóreo dos neonatos 41
4.2.3 Comprimento naso-anal dos neonatos 42
4.2.4 Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal dos neonatos 42
4.2.5 Evolução ponderal dos neonatos 44
4.2.6 Consumo de ração e ingestão hídrica da prole 45
4.2.7 Evolução ponderal da prole 47
4.2.8 Massa dos tecidos adiposos brancos 47
4.2.9 Índice de adiposidade 48
4.2.10 Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal nos machos e fêmeas das proles 48
4.2.11 Glicemia 52
4.2.12 Insulinemia 53
4.2.13 Peptídeo-C sérico 53
4.2.14 Leptina sérica 53
4.2.15 IGF-1 sérico 53
4.2.16 GTT 57
4.2.17 ITT 59
4.2.18 HOMA-IR 61
4.2.19 Expressão gênica 62
4.2.20 Metilação do DNA no promotor dos genes 69
5 DISCUSSÃO 80
6 CONCLUSÕES 89
7 ANEXOS 90
8 REFERÊNCIAS 91
Apêndice

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Adição de um grupo metil (CH_3) ao carbono 5 de resíduos de citosinas no DNA. A reação é catalisada por uma DNA-metiltransferase (DNMT) e usa a S-adenosil metionina (SAM) como doador do grupo metil. 12

Figura 2. Representação esquemática da metilação de DNA como mecanismo de silenciamento gênico, reprimindo a transcrição. 13

Figura 3. Representação esquemática da influência dos eventos adversos ocorridos ainda *in utero* sobre a progressão de doenças metabólica na idade adulta 16

Figura 4. Esfregaço vaginal evidenciando a presença de espermatozoides. 18

Figura 5. Protocolo experimental do grupo materno..... 19

Figura 6. Protocolo experimental do grupo prole 21

Figura 7. Esquema da conversão da sequência do DNA pela ação do bissulfito de sódio. ... 28

Figura 8. Exemplificação da conversão da sequência do DNA pela ação do bissulfito de sódio..... 29

Figura 9. Representação da reação enzimática do pirosequenciamento. 32

Figura 10. Preparação da amostra para a reação de pirosequenciamento 33

Figura 11. Consumo de ração materna durante a gestação. 36

Figura 12. Ganho de peso materno durante a gestação. 38

Figura 13. Correlação entre o ganho de peso materno durante a gestação e o tamanho da prole. 39

Figura 14. Evolução ponderal dos neonatos machos e fêmeas. 44

Figura 15. Teste de tolerância à glicose (GTT) nos machos das proles com 12 e 20 semanas de vida 57

Figura16. Teste de tolerância a glicose (GTT) nas fêmeas das proles com 12 e 20 semanas de vida 58

Figura 17. Teste de tolerância à insulina (ITT) nos machos das proles com 12 e 20 semanas de vida 59

Figura 18: Teste de tolerância à insulina (ITT) nas fêmeas das proles com 12 e 20 semanas de vida 60

Figura 19. Índice HOMA-IR nos machos e fêmeas das proles com 12 e 20 semanas de vida 61

Figura 20. Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de neonatos machos 62

Figura 21. Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de neonatos 63

Figura 22. Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de machos de proles com 20 semanas de vida 63

Figura 23. Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em músculo gastrocnêmio de machos de proles com 20 semanas de vida..... 64

Figura 24. Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em tecido adiposo branco retroperitoneal em machos de proles com 20 semanas de vida 65

Figura 25. Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de fêmeas de proles com 20 semanas de vida 66

Figura 26. Expressão gênica do receptor de insulina avaliada através de qRT-PCR em músculo gastrocnêmio de fêmeas de proles com 20 semanas de vida..... 67

Figura 27. Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em tecido adiposo branco retroperitoneal em fêmeas de proles com 20 semanas de vida 68

Figura 28. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado de machos das proles neonatais 69

Figura 29. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado de fêmeas das proles neonatais 70

Figura 30. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado dos machos das proles com 20 semanas de vida 71

Figura 31. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no músculo gastrocnêmio dos machos das proles com 20 semanas de vida 72

Figura 32. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no tecido adiposo retroperitoneal da prole de machos com 20 semanas de vida..... 73

Figura 33. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, I*ns2* e *Insr* no fígado das fêmeas das proles com 20 semanas de vida..... 73

Figura 34. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no músculo das fêmeas das proles com 20 semanas de vida 74

Figura 35. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1, Ins2 e Insr* no tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas das proles com 20 semanas de vida 74

Figura 36. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Lep* e *Lepr* no tecido adiposo retroperitoneal dos machos e das fêmeas de proles com 20 semanas de vida 75

Figura 37. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado de neonatos machos 76

Figura 38. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado de neonatos fêmeas 77

Figura 39. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado dos machos das proles com 20 semanas de vida 78

Figura 40. Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado de fêmeas das proles com 20 semanas de vida 78

Figura 41. Correlações entre o IGF-1 e o peso ao nascimento em neonatos machos 79

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo 26

Tabela 2: Sequência dos oligos iniciadores (*primers*), sense (*forward*) e anti-sense (*reverse*) utilizados para PCR e pirosequenciamento. 34

Tabela 3: Consumo de água materna durante a gestação. 37

Tabela 4: Tamanho total da prole e número de machos e fêmeas 38

Tabela 5: Massa do tecido adiposo branco gonadal, inguinal, mesentérico, retroperitoneal e índice de adiposidade materno 40

Tabela 6: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal em ratas gestantes 40

Tabela 7: Matriz de *Chi-quadrado* do número de natimortos 41

Tabela 8: Peso corpóreo e comprimento naso-anal de neonatos machos e fêmeas 42

Tabela 9: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal das proles neonatal de machos e fêmeas 43

Tabela 10: Evolução ponderal dos neonatos machos e fêmeas 45

Tabela 11: Consumo de ração dos machos e fêmeas da prole 46

Tabela 12: Ingestão hídrica da prole de machos e fêmeas 46

Tabela 13: Peso corpóreo das proles de machos e fêmeas 47

Tabela 14: Massa do tecido adiposo branco gonadal, inguinal, mesentérico, retroperitoneal e índice de adiposidade da prole com 12 semanas de vida 49

Tabela 15: Massa do tecido adiposo branco gonadal, inguinal, mesentérico, retroperitoneal e índice de adiposidade da prole com 20 semanas de vida 50

Tabela 16: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal nos machos e fêmeas das proles com 12 semanas de vida 51

Tabela 17: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal nos machos e fêmeas nas proles com 20 semanas de vida 52

Tabela 18: Glicemia dos machos e fêmeas das proles neonatais, com 12 e 20 semanas de vida 54

Tabela 19: Insulina sérica dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida 55

Tabela 20: Peptídeo-C sérico dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida 55

Tabela 21: Leptina sérica dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida 56

Tabela 22: IGF-1 sérico dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida 56

LISTA DE ABREVIATURAS

A, C, T, G	adenina, citosina, timina e guanina
Akt	proteína quinase B
APS	adenina 5-fosfosulfato
ATP	adenosina trifosfato
cAMP	adenosina monofosfato cíclico
DNA	ácido desoxirribonucleico
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar ao mRNA
CpG	dinucleotídeo citosina guanina
Ct	c*ycle thresold*
DEPEC	dietilpirocarbonato
dNTP	desoxirribonucletídeo trifosfato
DO	densidade óptica
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
et al.	e outros
DNMTs	DNA metiltransferases
gDNA	ácido desoxirribonucleico genômico
GH	hormônio de crescimento
GTT	teste de tolerância à glicose
HO	hipossódica
HO10	hipossódica na primeira metade da gestação

HO20	hipossódica na segunda metade da gestação
HOMA	*homeostatic model assessment*
HOMA-IR	*homeostatic model assessment insulin resistance*
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina (*insulin-like growth factor)*
IGF-1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF-2	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 2
IGFBP	proteína de ligação de alta afinidade do IGF (IGF*binding protein)*
IGF1R	receptor do IGF-1
Ins1	insulina 1
Ins2	insulina 2
Insr	receptor de insulina
ITT	teste de tolerância à insulina
Lep	leptina
Lepr	receptor de leptina
PPi	pirofosfato inorgânico
primer	oligonucleotídeo iniciador
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
rpm	rotações por minuto
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro
NR	normossódica
PCR	reação em cadeia da polimerase

RT	transcriptase reversa
RT-PCR	transcrição reversa seguida por PCR
qRT-PCR	PCR em tempo real quantitativo
SAM	S-adenosil metionina
TAR	tecido adiposo retroperitoneal
TBE	tampão Tris-borato-EDTA
Tm	temperatura de *melting* (desnaturação)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentagem
±	mais ou menos
> e <	maior e menor
ANOVA	análise de variância
ºC	grau Celsius
Na^+	sódio
Cl^-	cloreto
d	dia
dL	decilitro
EUA	Estados Unidos da América
g	grama
h	hora
kb	kilobase
kDa	quilo dalton
kg	quilograma
L	litro
min	minuto
mg	miligrama
mEq	miliequivalente
NaCl	Cloreto de sódio

nm	nanômetro
p	coeficiente de significância estatística
pb	par de base
pH	potencial hidrogeniônico
rpm	rotações por minuto
sem	semana
x	vezes
µg	micrograma
µL	microlitro

RESUMO

Siqueira FR. *Restrição no consumo de sódio durante a gestação é responsável pelo baixo peso ao nascimento e pela resistência à insulina da prole na idade adulta: estudo do mecanismo epigenético por metilação do DNA* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 101p.

Sabe-se que algumas alterações nutricionais maternas durante o período perinatal estão associadas com doenças metabólicas na vida adulta das proles, tais como diabetes melito tipo 2, resistência à insulina, obesidade e hipertensão arterial. O período da gestação em que estas alterações nutricionais influenciam a prole na idade adulta ainda não está elucidado. Modificações epigenéticas têm sido propostas como mecanismos responsáveis por estas desordens metabólicas. Ratas Wistar de doze semanas de idade foram alimentadas com dieta com conteúdo baixo (HO - 0,15% NaCl) ou normal (NR - 1,3% NaCl) de sódio desde o primeiro dia de gestação até o nascimento da prole ou HO durante a primeira (HO10) ou segunda (HO20) metade da gestação. O peso corpóreo e a ingestão de água e ração foram avaliados semanalmente durante a gestação. Teste de tolerância à insulina (ITT) e à glicose (GTT) e HOMA-IR foram realizados nas proles adultas. Expressão gênica por qRT-PCR e metilação do DNA na região promotora dos genes foram mapeadas utilizando tratamento com bissulfito de sódio e avaliadas por pirosequenciamento. O ganho de peso materno foi menor no HO e HO20 na terceira semana de gestação em comparação com NR e HO10. O peso ao nascimento da prole foi menor em machos e fêmeas dos grupos HO e HO20 em relação ao NR e HO10. O HOMA-IR foi maior nos machos com 12 semanas de idade do grupo HO em comparação com NR e com 20 semanas de idade do grupo HO10 em comparação com NR e HO20. Nas fêmeas com 12 semanas de idade o HOMA-IR foi maior no HO10 comparado com HO. Os níveis de insulina no soro foram maiores tanto nos machos com 20 semanas de idade do grupo HO10 comparado com NR quanto nas fêmeas com 12 semanas de idade do grupo HO10 comparado com HO. A área sob a curva do GTT indicou intolerância à glicose nos machos do grupo HO. A porcentagem de metilação das ilhas CpG no promotor dos genes de *Igf1*, *Igf1r*, *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado de machos e fêmeas neonatais e no fígado, tecido adiposo branco e músculo em machos com 20 semanas de idade foi influenciada pela baixa ingestão de sal durante a gestação. Nenhuma destas alterações foi identificada nas fêmeas com 20 semanas de idade. Em conclusão, a baixa ingestão de sal na segunda metade da gestação é responsável pelo baixo peso ao nascimento em ambos os sexos. A intolerância à glicose observada na prole adulta ocorreu somente se a dieta hipossódica é dada durante a gestação inteira. Por outro lado, a resistência à insulina em resposta ao consumo de dieta hipossódica durante a gestação está relacionada com o momento em que ocorre este insulto e com o envelhecimento da prole. Também foi observado que alterações na metilação do promotor do gene *Igf1* está correlacionado com o baixo peso ao nascimento em resposta a ingestão de dieta hipossódica durante a gestação.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Dieta hipossódica 3.Programação fetal 4.Baixo peso ao nascer 5.Intolerância à glicose 6.Resistência à insulina 7.Fator de crescimento similar à insulina tipo 1 8.Epigênese genética 9.Metilação do DNA 10. Ilhas de CpG 11.Expressão gênica

SUMMARY

Siqueira FR. *Sodium intake restriction during pregnancy is responsible for low birth weight and the insulin resistance of offspring in adulthood: a study of epigenetic mechanism by DNA methylation* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 101p.

It is known that some maternal nutritional alterations during pregnancy are associated with metabolic disorders in adult offspring, such as insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, obesity and arterial hypertension. The period of pregnancy in which these nutritional alterations influence adult offspring remains uncertain. Epigenetic changes are proposed to underlie these metabolic disorders. Twelve-week-old female Wistar rats were fed a low-salt (LS – 0.15% NaCl) or normal-salt (NS – 1.3% NaCl) diet since the first day of gestation until delivery or LS during the first (LS10) or second (LS20) half of gestation. Body weight, food and water intake were weekly evaluated during gestation. Blood glucose, insulin (ITT) and glucose (GTT) tolerance tests, HOMA-IR were performed in adult offspring. Gene expression and DNA methylation were mapped using bisulfite treatment evaluated by pyrosequencing in the male and female neonates and adult offspring. Weight gain was lower in LS and LS20 dams than in NS and LS10 dams in the third week of pregnancy. Birth weights were lower in male and female LS20 and LS rats compared with NS and LS10 neonates. HOMA-IR was higher in 12-week-old LS males compared with NS and in 20-week-old male LS10 rats compared with NS and LS20 rats. In 12-week-old LS10 females, HOMA-IR was higher than in LS. Serum insulin levels were higher in 20 week-old LS10 male compared with NS rats and in 12-week-old LS10 female compared to LS rats. The area under the curve of GTT indicated glucose intolerance in 12- and 20-week-old LS male. Methylation of CpG islands of the *Insr*, *Igf1*, *Igf1r*, *Ins1* and *Ins2* genes in liver in neonates male and female offspring and liver, white adipose tissue and muscle in 20-week-old male offspring were influenced by low-salt intake during pregnancy. None of these alterations was identified in 20-week-old females. In conclusion, low-salt diet consumption in the second half of pregnancy can result in low birth weights in the males and females offspring. Glucose intolerance observed in adult offspring occurred only if low salt intake was given throughout pregnancy. However, insulin resistance in response to low salt intake during pregnancy is related to the time at which this insult occurs and to the age of the offspring. Alterations in the DNA methylation of *Igf1* were observed to be correlated with low birth weight in response to low salt feeding during pregnancy.

Key words: 1.Rats Wistar 2.Low sodium diet 3.Fetal programming 4.Low birth weight 5.Glucose intolerance 6.Insulin resistance 7.Insulin-like growth factor 1 8.Epigeneses genetic 9.DNA methylation 10.CpG Islands 11.Gene expression

1 INTRODUÇÃO

A associação entre eventos ocorridos na fase precoce de desenvolvimento e doença cardiovascular tardia, já fora proposta em estudos epidemiológicos entre os períodos de 1930 a 1980 (Kermack et al, 1934; Forsdahl, 1977; Wadsworth et al, 1985). Mas, foi no final da década de 80 que David Barker e outros pesquisadores verificaram que alterações nos fatores ambientais, particularmente nutrição materna inadequada durante gestação, em períodos críticos de desenvolvimento fetal (períodos de rápida divisão celular) nos quais são formados os diversos órgãos e tecidos resultam em adaptações no desenvolvimento com mudanças permanentes na estrutura, fisiologia e metabolismo de sistemas, órgãos e tecidos do feto. Gerando consequências precoces (baixo peso ao nascimento) ou tardias (doenças na vida adulta). Seus estudos foram baseados em dados epidemiológicos de peso e tamanho ao nascimento em mais de dez mil homens colhidos na cidade de *Hertfordshire*, Inglaterra, durante os anos de 1911 e 1930 e mostraram pela primeira vez que o risco de doença coronariana diminui à medida que o peso ao nascimento é mais elevado, pois os dados mostraram que a mortalidade por doença coronariana foi duas vezes maior nos indivíduos com baixo peso ao nascimento (Barker et al., 1986; Barker et al., 1989). Esse fenômeno ficou conhecido como a hipótese da "origem fetal" da doença no adulto ou "hipótese de Barker".

Diversos estudos epidemiológicos e experimentais confirmaram a "hipótese de Barker" mostrando que fatores ambientais, por exemplo, desnutrição materna durante o desenvolvimento fetal pode influenciar o fenótipo da prole adulta. Especificamente, os insultos que ocorrem em ambientes nutricionais restritos durante a gestação ou lactação estão associados a alterações no metabolismo de lípides, na sensibilidade à insulina, ao desenvolvimento da resistência à insulina, diabetes melito, obesidade, modificações no desenvolvimento renal e hipertensão arterial na vida adulta (Barker et al, 1989; De Boo & Harding, 2006; Godfrey & Barker, 2001; Muhlhausler et al, 2009; Zandi-Nejad et al, 2006).

O processo pelo qual um estímulo ou insulto age durante um período sensível ou crítico no desenvolvimento, incluindo fetal e/ ou períodos precoces pós-natal, capaz de programar alterações permanentes na estrutura e função celular, tecidual e/ou de órgãos e sistemas é denominado nos dias de hoje como "programação" e é avaliado numa gama de protocolos experimentais em animais de laboratório (Jimenez-Chillaron et al, 2006).

Em termos evolutivos, esse fenômeno tende a refletir os benefícios da plasticidade durante o desenvolvimento precoce (Godfrey & Barker, 2001). Além disso, foi observado que a programação permanente pode ser transmitida para futuras gerações, levando ao conceito dos efeitos epigenéticos e transgeracionais.

Um crescente corpo de evidências sugere que o rápido ganho de peso pós-natal, conhecido como *catch-up growth*, também está associado com o aumento da suscetibilidade à obesidade e diabetes tipo 2. O risco associado ao *catch-up growth* é ainda maior quando é caracterizado por aumentos rápidos de peso e comprimento/ altura, na vida pós-natal precoce. Tais padrões de crescimento pós-natal acelerado são comuns em indivíduos que são pequenos para a idade gestacional e pode ser considerada uma adaptação fisiológica que lhes permite atingir o seu peso e/ ou altura geneticamente programada após um período de crescimento retardado. Os indivíduos que são pequenos no nascimento e têm *catch-up growth* pós-natal possuem alto risco de desenvolverem obesidade central, intolerância à glicose e diabetes (Huxley et al., 2000).

Jimenez-Chillaron e colaboradores (2006) em seu modelo experimental de 50% de restrição alimentar durante a gestação mostraram que a prole de camundongos machos que são pequenos ao nascimento e exibem precoce *catch-up growth* pós-natal desenvolvem intolerância a glicose e obesidade com seis meses de idade. Em contraste, os camundongos com baixo peso ao nascimento que não exibem *catch-up growth* permaneceram menores que o grupo controle, mas, a intolerância a glicose e a obesidade são prevenidas.

A regulação do crescimento fetal difere significativamente da regulação do crescimento pós-natal. O crescimento pós-natal é em grande parte determinado pela composição genética do indivíduo, enquanto a nutrição desempenha um papel permissivo. Já no crescimento fetal a disponibilidade de nutrientes para o feto é determinante, enquanto o genoma exerce um papel limitado. O crescimento fetal deve ser visto, portanto, como limitado pela nutrição (Bauer et al., 1998). Confirmando estes achados, Morris e colaboradores (2009) apontam que após o nascimento, quando os efeitos do ambiente materno uterino não estão mais presentes, o crescimento é determinado por fatores genéticos. O crescimento pré-natal depende da complexa interação entre três sistemas distintos, os quais se encontram em intima interação: mãe, placenta e feto.

A implantação e o período embrionário inicial são relativamente independentes dos fatores ambientais, relacionando-se principalmente, com fatores genéticos inerentes

ao embrião. Em contraste, na última fase da gestação, quando a maior parte da organogênese já se completou, o crescimento fetal é acelerado e o ambiente intrauterino passa a ser de fundamental importância para o crescimento e desenvolvimento normal.

A placenta desempenha um papel crucial no crescimento e deve integrar os sinais do feto e da mãe, na tentativa de atender a demanda fetal com a oferta de alimento materna. Esses aspectos da função da placenta podem ser divididos em três principais componentes: a transferência de nutrientes, funções metabólicas e funções endócrinas (Bauer et al., 1998).

Como a glicose fetal é obtida principalmente da mãe através da placenta, a insulina fetal não parece ser essencial para a manutenção da euglicemia fetal (Liang et al., 2010). O feto começa a acumular glicogênio hepático durante a segunda metade da gestação. Estes estoques de glicogênio são importantes após o nascimento, quando o fornecimento de glicose da mãe é interrompido, e a lactação ainda não se iniciou o neonato apresenta subitamente um estado de jejum. Durante este tempo, a glicose deve ser rapidamente gerada a partir de fontes endógenas quebrando os estoques de glicogênio hepático e iniciando o processo de gliconeogênese (Margolis & Seminara, 1988).

Após o período da embriogênese, o ambiente fetal é programado para otimizar o crescimento corporal e o desenvolvimento dos órgãos por diversos fatores de crescimento gerais e específicos.

O ambiente endócrino fetal é altamente dependente dos hormônios maternos, uma vez que a placenta é impermeável à maioria dos hormônios peptídicos. Os hormônios maiores que 0,7 a 1,2 kd têm pequeno ou nenhum acesso ao compartimento fetal (Fisher, 2006).

Adicionalmente, sabe-se que os principais mediadores hormonais do crescimento fetal são a insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF – *insulin-like growth factors*). Estes, por sua vez regulados pelo fornecimento de nutrientes ao feto. Assim, a redução do suprimento de glicose para feto resulta na diminuição da insulina circulante e nas concentrações de IGF e subsequente redução do crescimento fetal. Já que a nutrição tem um papel central na regulação do crescimento fetal, ela é um bom candidato para um estímulo de programação fetal, assegurando um papel central na ligação entre tamanho no nascimento e o risco de doença subsequente (Oliver et al., 2002).

A insulina é um dos principais reguladores da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular e é sintetizada pelas células β pancreáticas. A insulina regula a homeostase de glicose em vários níveis, reduzindo a produção hepática de glicose (via diminuição da gliconeogênese) e aumentando a captação periférica de glicose, principalmente nos tecidos sensíveis a insulina, músculo, adiposo e fígado. A insulina também estimula a lipogênese no fígado e nos adipócitos (Dube et al., 2013).

A expressão do gene da insulina é detectada precocemente no desenvolvimento embrionário do pâncreas e se mantém rigorosamente regulado na vida adulta. Há evidência que a restrição do crescimento fetal conduz a redução do número de células β e diminuição na capacidade da produção de insulina pelo pâncreas (Kuroda et al, 2009).

O gene da insulina consiste em três éxons e dois íntrons no ser humano e na maioria dos vertebrados, exceto para os roedores, o genoma do roedor contém dois genes de insulina altamente relacionados, mas não alélicos nomeados *Ins1* e *Ins2*, e possuem mais de 90% de homologia na sequência de nucleotídeos (Wentworth et al., 1986). O gene *Ins2* tem maior semelhança estrutural e funcional para outros genes de insulina de mamíferos, enquanto que *Ins1* é considerado um retroposon funcional, uma vez que contém apenas um íntron, em vez de dois íntrons como são encontrados no *Ins2* e nos genes da insulina de outras espécies (Wentworth et al., 1986).

A embriogênese do pâncreas é mediada por uma série de genes *homeobox* e por fatores de transcrição na programação do camundongo com o brotamento do pâncreas a partir do tubo digestivo, desenvolvimento dos ductos ramificados e do epitélio indiferenciado, diferenciação das linhagens celulares exócrinas e endócrinas e organização das células endócrinas nas ilhotas de Langerhans. O processo nos camundongos começa no dia 8 dos 22 dias de gestação e se estende até 2 a 3 semanas após o nascimento. Os membros da família de fatores de crescimento dos IGFs contribuem para o crescimento e diferenciação pancreática (Habener et al., 2005).

Em ratos, a resposta secretora de insulina em resposta à glicose inicia-se por volta dos 4 a 5 últimos dias de gestação (Holness et al., 2000).

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina tipo 1 e 2 (IGF-1 e IGF-2) também estimulam o crescimento do feto e da placenta. A deleção dos genes *Igf1*, *Igf2* ou do receptor de IGF-1 (*Igf1r*) retarda o crescimento fetal. A síntese de IGF-1 é comprometida na vigência de desnutrição materna (Gicquel & Bouc, 2006).

Provavelmente estes fatores estão envolvidos com o baixo peso ao nascimento (Roberts et al., 2008).

A expressão dos genes de fatores de crescimento semelhantes à insulina é regulada de maneira tecido específica e pode ser alterada por condições *in utero* nutricionais e endócrinas (Duffield et al., 2008). Em geral, o gene *Igf1* é mais responsivo a esses estímulos que o gene *Igf2*. Assim, enquanto o gene *Igf1* regula o crescimento e desenvolvimento fetal em relação ao fornecimento de nutrientes, o gene *Ifgf2* parece produzir uma unidade constitutiva para o crescimento intrauterino via ação placentária e parácrina sob os tecidos fetais (Fowden, 2003).

O IGF-1 é um hormônio anabólico sintetizado principalmente no fígado e em tecidos periféricos sob o controle do hormônio de crescimento pituitário (GH) (Maggio et al., 2013).

Gluckman e colaboradores (2005) demonstraram que há uma correlação direta entre o tamanho do recém-nascido com as concentrações no cordão umbilical de IGF-1 e são diretamente influenciadas pelo estado nutricional do feto.

Os fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 são polipeptídeos de aproximadamente 7,5kDa de cadeia simples que promovem o crescimento, tanto antes como após o nascimento. Eles afetam o metabolismo, a mitogênese e a diferenciação de uma ampla variedade de tipos celulares, incluindo a placenta através da ligação a receptores de IGF (IGF1R e IGF2R), receptores de insulina (InsR) e um receptor híbrido de IGF1R – InsR. A sua biodisponibilidade é influenciada por pelo menos seis proteínas de ligação de alta afinidade a IGF (IGFBP – IGF *binding protein*), atualmente bem caracterizadas do ponto de vista bioquímico e molecular (IGFBP1 a IGFBP6). Os IGFBPs prolongam à meia-vida dos IGFs na circulação e transportam os IGFs aos seus receptores (Sferruzzi-Perri et al., 2011). Juntos, os IGFs, os seus receptores e as proteínas de ligação formam o eixo de IGF, o qual responde a uma série de sinais ambientais, incluindo nutrientes, oxigênio e hormônios, tais como o hormônio do crescimento (GH), o cortisol, a insulina, os hormônios da tiroide e os esteroides sexuais. O IGF-1 circulante encontra-se sob a forma de complexo ternário de 150 kDa, composto de uma molécula de IGF-1, uma molécula de IGFBP3 e uma glicoproteína derivada do fígado (subunidade ácido lábil – ALS), o qual prolonga a meia vida do IGF-1 circulante (Holman & Baxter, 1996; Sferruzzi-Perri et al., 2011).

Enquanto que o IGF-1 parece regular o crescimento fetal em resposta a disponibilidade de nutrientes, o IGF-2 parece proporcionar o estímulo constitutivo de crescimento feto placentário (Fowden, 2003).

Antes do nascimento, os IGFs são reguladores de crescimento parácrinos sintetizados por vários tecidos fetais, independente do GH (Fowden, 2003). As concentrações séricas de IGF-1 ao nascimento são baixas e oscilam durante a vida. Após o nascimento os níveis de IGF-1 tendem a aumentar, devido, principalmente, ao início da síntese hepática de IGF-1 dependente de GH, embora uma variedade de outros tecidos continue a produzir IGF-1. Na puberdade os valores de IGF-1 são quase três vezes maiores que nos adultos e tendem a diminuir gradativamente com a idade. (Sferruzzi-Perri, et al., 2011). Após o completo crescimento pós-natal, o papel dos IGFs é menos claro na literatura, podendo estar envolvidos no crescimento de tecidos adultos, durante as condições fisiológicas, tais como a cicatrização de feridas, o exercício e a gravidez (Sferruzzi-Perri, et al., 2011).

Existem várias fontes potenciais de IGFs durante a gestação. Em várias espécies, os IGFs são produzidos por uma variedade de tecidos que podem aumentar em massa, durante a gravidez, incluindo o fígado, útero, musculatura esquelética e tecido adiposo (Sferruzzi-Perri, et al., 2011).

O crescimento fetal também é promovido pela insulina por seu efeito lipogênico, independente do IGF-1, provocando aumento do tecido adiposo fetal quando as concentrações de insulina são elevadas, como em fetos de mãe com diabetes descompensados (Milner & Hill, 1984).

Resumindo, a regulação da secreção de IGF-1 e do crescimento pré-natal é realizada pelo eixo glicose-insulina-IGF-1. A placenta transfere glicose para o feto, o que estimula a secreção de insulina fetal que determina a secreção de IGF-1 (Gluckman & Harding, 1997). Durante o período pré-natal o GH exerce pouca influência no crescimento fetal, enquanto que na vida pós-natal ele passa a ser o principal regulador da expressão de IGF-1 e o sistema GH/IGF-1 passa a ser o principal determinante do crescimento linear.

Estudos em animais *knockout* identificaram vários genes importantes na determinação do crescimento fetal, tais como os genes *Igf1*, *Igf2*, *Ins* (insulina) e seus respectivos receptores. Camundongos *knockout*, tanto para o gene *Igf1*, como para o *Igf2*, apresentam um importante grau de restrição de crescimento intrauterino,

comprovando a importância desses dois hormônios no crescimento fetal. Os animais duplo *knockout* de *Igf1r* e *Igf1*, ou somente *Igf1r*, apresentam um déficit de crescimento grave. Os animais duplo *knockout Igf2/Igf2r* apresentam um leve retardo do crescimento, pois o principal receptor do *Igf2* é o *Igf1r*. O *knockout* de genes que codificam as IGFBPs, a subunidade ácido-lábil (ALS), outros hormônios e receptores como o da insulina e o receptor do GH, influenciam de forma menos expressiva no crescimento fetal (Baker et al., 1993; Liu et al.; 1993).

Foi observado que recém-nascidos a termo com baixo peso e com concentrações de insulina circulante (Economides et al., 1991) e de IGF-1 diminuídos (Enzi et a.l, 1981), apresentam um período de crescimento acelerado nos primeiros anos de vida. Este período de crescimento acelerado está associado com uma sensibilidade à insulina aumentada e subsequente desenvolvimento de resistência à insulina (Muhlhausler et al., 2009).

A resistência à insulina é uma condição genética ou adquirida, na qual a captação periférica de glicose está reduzida, havendo concomitante aumento da concentração circulante de insulina.

O IGF é um dos mais importantes fatores de crescimento no desenvolvimento do tecido adiposo. A indução experimental de deficiência global do receptor de IGF-1 (IGF1R) em camundongos produz restrição no crescimento e reduz a massa do tecido adiposo em relação a outros tecidos (Holzenberger et al., 2001). Em nível fisiológico o IGF estimula tanto a proliferação como a diferenciação de pré-adipócitos em cultura celular. cAMP (adenosina monofosfato cíclico) e glicocorticoides são necessários para indução de diferenciação celular tanto em meios de cultura contendo soro ou em meios de cultura livre de soro (Marques et al., 2000).

Há evidência de que a leptina produzida pela placenta e no tecido adiposo fetal estimula o crescimento e desenvolvimento do feto (Stocker et al., 2005). Ao mesmo tempo, alguns estudos têm mostrado a importância do papel da leptina no desenvolvimento de doenças relacionadas à programação fetal e este efeito parece ser modulado pela nutrição pré e pós-natal (Vickers, 2007; Milagro et al., 2009).

A leptina é um hormônio de 16 kDa, também conhecida como o produto do gene *ob*, sintetizada e secretada principalmente pelo tecido adiposo branco e, em escala menor, pela medula óssea, placenta, estômago e tecido hipotalâmico (Campfield & Smith, 1998). Desenvolve um papel chave na regulação do peso corpóreo, na modulação do apetite, função neuroendócrina, no balanço energético e no metabolismo dos lipídeos e da glicose (Milagro et al., 2009; Mantzoros et al., 2011).

A leptina esta presente na circulação de fetos humanos e roedores pouco antes do nascimento. Em humanos, isso se deve ao fato de que o desenvolvimento do tecido adiposo branco ocorre no final do período fetal, já nos roedores o tecido adiposo branco se desenvolve apenas depois do nascimento e a placenta é a principal fonte de leptina no final do período fetal (Villarroya et al., 2001).

Após o nascimento há um declínio nos níveis de leptina circulante, embora em roedores uma análise em curto prazo mostrou que há um pico transitório dos níveis de leptina no sangue, no primeiro dia após o nascimento. É improvável a leptina estar envolvida no controle do balanço energético durante o período fetal, mas ela pode estar envolvida na regulação do desenvolvimento. No entanto, logo após o nascimento, os mecanismos de regulação da captação e do gasto de energia já estão em funcionamento. O início da amamentação, a qual constitui um novo meio de ingestão de nutrientes e necessidades termogênicas após nascimento são grandes desafios metabólicos para o neonato. Deste modo, a expressão dos genes das UCPs (*uncoupling proteins*), especialmente UCP1 e UCP3, é ativada apenas após o nascimento. O papel da leptina no controle da expressão gênica em relação ao metabolismo energético ao nascimento não é conhecido e também ainda não foi estabelecido se os mecanismos de resposta à leptina são desenvolvidos ao nascimento (Villarroya et al., 2001).

Além disso, a secreção de leptina pelos adipócitos pode ser estimulada pela insulina (Margetic et al., 2002). Em estudos clínicos o nível de leptina também está associado com a resistência à insulina e a diabetes por alterar tanto a sensibilidade quanto à secreção de insulina (Mantzoros et al., 2011).

Modelos experimentais de restrição de crescimento intrauterino tais como ligadura da artéria uteroplacentária (Wadley et al., 2008), restrição global de nutriente (Jimenez-Chillaron et al, 2006) e dieta hipoprotéica (Lillycrop et al., 2005) materna têm sido usadas para investigar a associação do baixo peso ao nascimento e o desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta (Wlodek et al., 2007).

No final da década de 60, Ganguli e colaboradores (1969) mostraram que para uma reprodução adequada é necessária à ingestão de uma dieta contendo no mínimo 0,05% de sódio (0,12% de NaCl) desde antes do acasalamento e durante as três semanas de gestação. Já no final da década de 80 Bird & Contreras (1987) proposuream que o mínimo necessário para uma reprodução com sucesso é 0,08% de NaCl e níveis abaixo desse montante conduz a altos níveis de mortalidade. É conhecido de que a

organogênese ocorre durante a segunda semana de gestação no rato enquanto que a terceira semana é o período de crescimento fetal máximo.

Estudos com restrição de sódio (0,03% de sódio – 0,08% de NaCl) na dieta na última semana de gestação verificaram diminuição no peso corpóreo de ratas Sprague-Dawley grávidas, indução de parto prematuro, sem alteração no tamanho da ninhada (Bédard et al., 2005), menor volume plasmático e baixo peso fetal (Roy-Clavel et al., 1999).

Resultados prévios do nosso laboratório, no qual ratas Wistar foram alimentadas com dieta hipossódica (0,06% de sódio – 0,15% de NaCl) desde a oitava semana de vida, durante o período gestacional até o final da lactação, mostrou associação entre a restrição de sódio na dieta materna com baixo peso ao nascimento e maiores níveis plasmáticos de colesterol e triacilgliceróis na idade adulta das proles (Vidonho et al., 2004; Lopes et al., 2008). A leptina plasmática foi maior em machos da prole adulta e nas fêmeas da prole foi observado um índice de adiposidade aumentado e menor leptina circulante (Lopes et al., 2008). A resistência à insulina foi observada nos machos adultos, confirmada através do *clamp* euglicêmico hiperinsulinêmico, mas não nas fêmeas das proles (Vidonho et al., 2004).

Esses achados possivelmente indicam que a dieta hipossódica durante o período pré-natal induz ao baixo peso ao nascimento da prole e durante os períodos pré e pós-natal interfere no metabolismo lipídico e é responsável pela resistência à insulina na vida adulta das proles. Porém, o exato período antes e durante a gestação e lactação responsável por esses feitos biológicos adversos na prole ainda não foi estabelecido.

Atualmente, um dos modelos animais mais utilizados de programação nutricional é a desnutrição materna causando mudanças substanciais na estrutura e função de vários órgãos na prole. Por exemplo, ratas prenhes alimentadas com uma dieta hipoproteíca dão à luz a filhotes susceptíveis de desenvolver intolerância à glicose, especialmente quando alimentados com uma dieta rica em gordura após o desmame (Desai et al., 1997). Além disso, estes resultados estão associados com alterações permanentes na expressão de genes envolvidos na homeostase da glicose (Holness et al., 2000; Ozanne et al., 1996). No entanto, os mecanismos moleculares responsáveis pela programação nutricional não são bem compreendidos. Alterações epigenéticas podem desempenhar um papel importante no mecanismo da associação entre eventos que ocorrem no início da vida e alterações na vida adulta.

Um mecanismo pelo qual exposição pré-natal e pós-natal pode ser ligado a alterações fenotípicas mais tardias na vida é a alteração de marcas epigenéticas, que têm um papel central na determinação funcional da informação que é armazenada no genoma.

Um questionamento a ser considerado é se as modificações metabólicas e funcionais observadas na prole durante a restrição de sódio materna são devidas a alterações epigenéticas.

O biólogo do desenvolvimento Conrad Waddington definiu pela primeira vez o termo "epigenética" na década de 1940 como: "... as interações dos genes com o seu ambiente levam o fenótipo a se expressar". Já em 1975 Holliday e Pugh propuseram que modificações químicas covalentes no DNA, incluindo a metilação dos dinucleotídeos citosina-guanina (CpG), foram os mecanismos moleculares por trás da hipótese de Conrad Waddington. Na década de 90 a epigenética foi descrita como o estudo das alterações da expressão gênica que ocorre sem modificação da sequência do DNA, mas, por modificação da metilação do DNA e remodelamento da cromatina (Jirtle & Skinner, 2007).

Atualmente, o termo epigenética refere-se a alterações na expressão gênica mitoticamente e meioticamente hereditárias (herdáveis durante a divisão celular), que não envolve alterações na sequência de nucleotídeos do DNA (Jirtle & Skinner, 2007). É importante ressaltar que as mudanças epigenéticas herdadas por mitose das células somáticas, proporcionam um mecanismo potencial pelo qual os efeitos ambientais sobre o epigenoma pode ter efeitos em longo prazo sobre a expressão gênica. O epigenoma pode ser compreendido por padrões epigenéticos globais que se distinguem ou são variáveis entre os tipos celulares. Esses padrões incluem a metilação do DNA, modificações de histonas e proteínas associadas à cromatina (Jirtle & Skinner, 2007).

Todas as células de um organismo compartilham a mesma sequência de DNA, desde o momento que são células tronco até serem células totalmente diferenciadas, diferindo muito em relação ao perfil de genes que expressam.

As alterações epigenéticas possuem papel fundamental na expressão gênica humana, particularmente durante a embriogênese. Sugerindo assim, que um ambiente adverso seja na fase perinatal ou neonatal é responsável por modificações epigenéticas levando a alterações no crescimento e no metabolismo na vida adulta (Cutfield et al, 2007). Além disso, as alterações epigenéticas também podem ser herdadas transgeracionalmente, afetando potencialmente a saúde das gerações futuras – uma teoria a qual está cada vez mais evidente, explicando assim, mudanças fenotípicas hereditárias, mas não genéticas (Morgan et al., 1999; Anway et al., 2005; Anway & Skinner, 2006).

A modificação das histonas e a metilação do DNA são os principais mecanismos epigenéticos que participam da regulação da expressão gênica, pois estão implicadas na manutenção da estabilidade do genoma e na regulação da transcrição (Jirtle & Skinner, 2007).

Esses fenômenos epigenéticos estão ligados pelo fato de que o DNA encontra-se intimamente complexado a proteínas especializadas, como as histonas, formando o que chamamos de cromatina (Kornberg, 1974). Um grande número de enzimas modificadoras da cromatina foi identificado nas últimas décadas. Essas enzimas fazem parte de grandes complexos que podem catalisar a incorporação ou remoção de modificações covalentes das histonas. Vários tipos de modificações covalentes e não covalentes das histonas foram identificados e demonstrados como influenciadores da regulação da expressão gênica. A acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, são alguns tipos de modificações covalentes das histonas (Jirtle & Skinner, 2007).

Modificações epigenéticas podem ser observadas pela metilação do DNA que está presente em grau variado em quase todos os eucariotos. A metilação do DNA ocorre pela adição do grupo metil ao carbono 5 de resíduos de citosinas, principalmente em dinucleotídeos de citosina e guanina (CpG). Os dinucleotídeos estão pouco representados no genoma de mamíferos, no entanto, comuns em determinadas regiões denominadas ilhas CpGs (Waterland & Jirtle, 2004).

As ilhas CpGs são definidas como regiões genômicas do DNA e apresenta em média um tamanho de pelo menos 200pb. São regiões ricas de repetições de nucleotídeos citosina e guanina adjacentes e estão pouco representados no genoma de mamíferos. No entanto, essas ilhas são frequentemente encontradas nas regiões promotoras, localizadas na proximidade das extremidades 5’ dos genes, frequentemente se estendo para dentro do primeiro éxon e também em regiões intragênicas (Jirtle e Skinner, 2007; Mckay et al, 2008).

Estima-se que aproximadamente 60% dos genes humanos possuem ilhas CpGs localizadas em regiões promotoras. Os promotores de mamíferos podem ser separados em duas classes: os promotores enriquecidos em elementos *TATA-box*, que são mais conservados e mais definidos e os promotores ricos em CpGs, que são mais plásticos (Carninci et al., 2006).

A metilação do DNA se dá pela ligação covalente de um grupo metil (CH_3) ao carbono da posição 5 da citosina de um dinucleotídeo de CpG, através da DNA-metiltransferases (DNMTs), transformando em 5-metil-citosina (Arenas-Huertero &

Recillas-Targa, 2006). As DNA-metiltransferases são as enzimas responsáveis pela transferência do radical metil do S-adenosil metionina (SAM) para o carbono 5 da citosina (Figura 1). As DNMTs são agrupadas em duas classes gerais: as *de novo* e a de manutenção. A primeira é responsável pela metilação de citosinas do DNA previamente não metiladas. Fazem parte desta classe as DNMT3a e DNMT3b. Já a última é responsável pela manutenção do padrão de metilação durante a replicação do DNA, DNMT1 (Jaenisch & Bird, 2003).

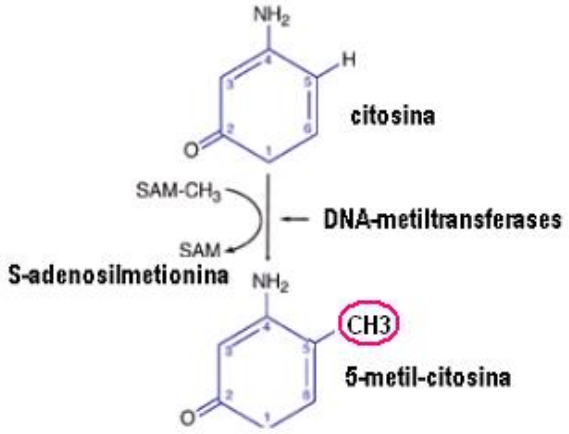


Figura 1. Adição de um grupo metil (CH_3) ao carbono 5 de resíduos de citosinas no DNA. A reação é catalisada por uma DNA-metiltransferase (DNMT) e usa a S-adenosil metionina (SAM) como doador do grupo metil

A maior parte das ilhas CpGs não se encontram metiladas durante todos os estágios de desenvolvimento ou em todos os tipos teciduais (Antequera &Bird, 1993).

Os padrões da metilação são amplamente estabelecidos durante a embriogênese ou na vida pós-natal precoce. A metilação do DNA também desempenha um papel na diferenciação celular através do silenciamento da expressão de genes específicos durante o desenvolvimento e na diferenciação dos tecidos nos indivíduos, assim o tempo da metilação é tecido e gene específico (Bird, 2002).

Em células somáticas normais o padrão da metilação do DNA é um estado que pode ser herdado ao longo das sucessivas divisões celulares, o que sugere que a metilação possa ser considerada como um fenômeno de memória celular (Bird 2002). Uma vasta alteração no perfil da metilação do DNA pode ser observada durante a embriogênese (Santos et al., 2002). Nos estágios iniciais do desenvolvimento, os níveis de metilação do DNA das células germinativas declinam para aproximadamente 30% do

nível típico observado nas células somáticas. O reestabelecimento do padrão básico da metilação é então atingido no estágio de implantação do embrião, por meio da metilação *de novo* do DNA. A metilação *de novo* de ilhas CpGs está envolvida no silenciamento estável da expressão gênica durante o desenvolvimento embrionário, sendo este fato essencial para o desenvolvimento completo do embrião. Esse fenômeno tem sido diretamente implicado em *imprinting* genômico e inativação do cromossomo X (Jirtle & Skinner, 2007). O evento da metilação *de novo* em células germinativas ou nos estágios iniciais do desenvolvimento sugere que esta seja particularmente ativa nestes estágios. No entanto, há evidências que a metilação *de novo* possa também ocorrer em células somáticas adultas (Burdge et al., 2007).

Um dos possíveis mecanismos de silenciamento gênico é através da metilação de um promotor, particularmente na região próxima ao sítio de início de transcrição. Esta metilação pode levar ao recrutamento de repressores tais como proteínas que se ligam a grupos metil, ao remodelamento da cromatina ou a inibição de fatores de transcrição, interrompendo a transcrição e, consequentemente, a expressão gênica (Carless, 2009), (Figura 2).

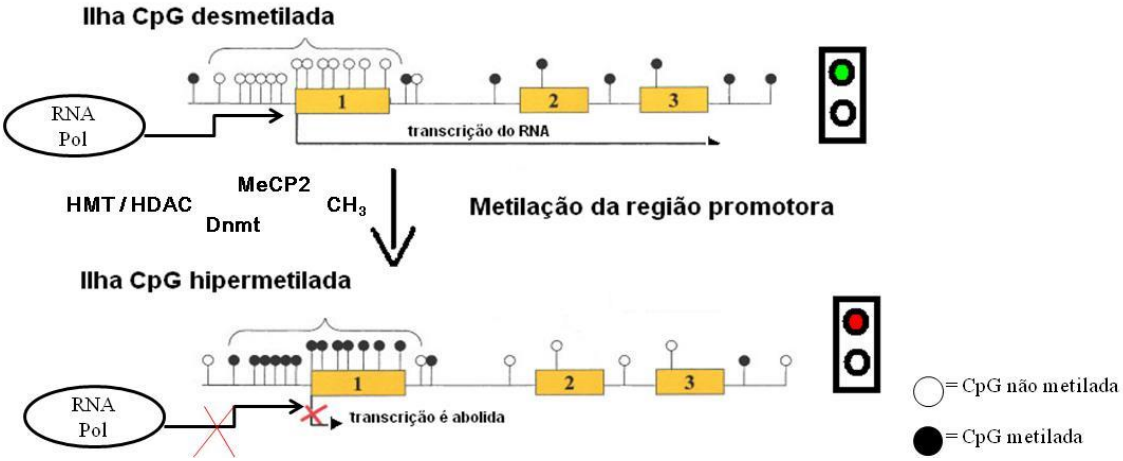


Figura 2. Representação esquemática da metilação de DNA como mecanismo de silenciamento gênico, reprimindo a transcrição. As caixas amarelas representam os éxons do gene, os círculos representam dinucleotídeos CpG. Os círculos pretos representam a presença do grupamento metil na citosina, os círculos brancos denotam ausência deste. Quando os dinucleotídeos CpGs estão desmetilados no promotor, a RNA polimerase pode se ligar e a região codificadora é transcrita. A metilação nos CpGs por a atividade das DNA-metiltransferases (Dnmt) pode permitir a participação de proteínas ligadoras de metil-CpG (MeCP2), que por sua vez, recruta as enzimas modificadoras da cromatina ativadoras (histona desacetilase (HDAC) e/ou histona metiltransferase (HMT). O complexo HDAC HMT remove grupos acetil das histonas e metila resíduos de lisina específicos. O efeito global da metilação do DNA e da histona é induzir silenciamento a longo prazo da transcrição (Burdge et al., 2007 – modificado)

Uma vez que a regulação epigenética dos promotores dos genes é estabelecida durante o desenvolvimento e mantida durante toda a vida do organismo conferindo padrões de expressão transcripcional e silenciamento, tais processos constituem um forte mecanismo molecular para a indução de alterações persistentes no fenótipo (Burdge et al., 2009).

Estudos têm mostrado que as reações de metilação são ativadas pelo metabolismo de um carbono e o grau de metilação do DNA depende do intercâmbio entre os aminoácidos homocisteína e metionina na presença de folato, das vitaminas B12 e piridoxina presentes na composição da dieta que os ratos recebem durante a gestação. Mas também têm mostrado que outros fatores tais como inflamação, estresse oxidativo e envelhecimento alteram o padrão de metilação do DNA (Milagro et al, 2009). Mudanças no metabolismo da metionina aumentam a produção de homocisteína, levando a alterações na metilação do DNA no feto e perturbações importantes na organogênese e na vasculogênese embrionária (Pogribny et al, 1995). De fato, alguns pesquisadores manipularam a disponibilidade de doadores de grupos metil na dieta materna e demonstraram que isso pode afetar a metilação global do DNA na prole (Cooney et al., 2002; Waterland et al., 2008). Lillycrop e colaboradores (2005) mostraram que a nutrição materna com restrição de proteína reduz a metilação do receptor do gene de glicocorticoide no fígado das proles. A adição de folato (9%) na dieta materna destas mães previne a redução da metilação.

Outro trabalho com modelo de restrição de proteína (8%) durante a gestação e lactação (modelo de desnutrição) no qual a prole exibe baixo peso ao nascimento e elevação da pressão sanguínea sistólica e diastólica com apenas quatro semanas de vida (Langley-Evans, 2000) demonstra que, neste modelo, a expressão do gene do receptor de angiotensina AT1b na glândula supra-renal é regulada na primeira semana de vida da prole, resultando num aumento da expressão da proteína do receptor e consequente aumento da capacidade de resposta da angiotensina adrenal. Além disso, o promotor do gene AT1b na adrenal é significativamente desmetilado e em *in vitro*, a expressão do gene AT1b é altamente dependente da metilação do promotor. Demonstrando que o promotor do gene AT1b é altamente suscetível a regulação por metilação do DNA e é de fato menos metilado em animais programados cujas mães foram expostas à restrição proteica durante a gestação. Estes dados sugerem uma ligação direta entre os fatores

ambientais que causam a hipertensão materna e a modificação epigenética de um promotor do gene (Bogdarina et al., 2007).

Ding e colaboradores (2010) demonstraram que a ingestão de dieta hipersódica durante a gestação afeta o desenvolvimento do coração e induz alterações no sistema renina-angiotensina na prole adulta. Além disso, a expressão dos receptores de angiotensina II no coração dos fetos é seletivamente alterada pela dieta hipersódica materna e essa alteração esta associada com a metilação do DNA e persiste na prole adulta.

O modelo animal de programação fetal causada pela restrição de sódio materna do nosso laboratório causa alterações substanciais no fenótipo da prole. Entretanto, o mecanismo molecular responsável pela programação ainda precisa ser elucidado. As alterações epigenéticas como, por exemplo, a metilação do DNA implicadas na manutenção da estabilidade do genoma e na regulação da transcrição pode ser um dos mecanismos responsáveis pelas alterações no fenótipo da prole. Assim, no presente trabalho procuramos verificar se o padrão de metilação dos genes na prole é alterado e associado com a programação fetal e com as consequências fenotípicas na vida da prole pela ingestão de dieta hipossódica materna. Em estudo anterior verificamos que prole de mães alimentadas com dieta hipossódica desde antes da gestação até o final da lactação tem baixo peso ao nascimento e resistência à insulina na idade adulta. Utilizamos um novo protocolo experimental para verificar se o mesmo efeito ocorre em resposta ao consumo de dieta hipossódica restrita ao período gestacional, e para identificar os períodos durante a gestação, que são críticos para o desenvolvimento dessas vulnerabilidades. Também como a influência da duração, a natureza e a intensidade dessas alterações fenotípicas sobre as modificações epigenéticas que se seguem.

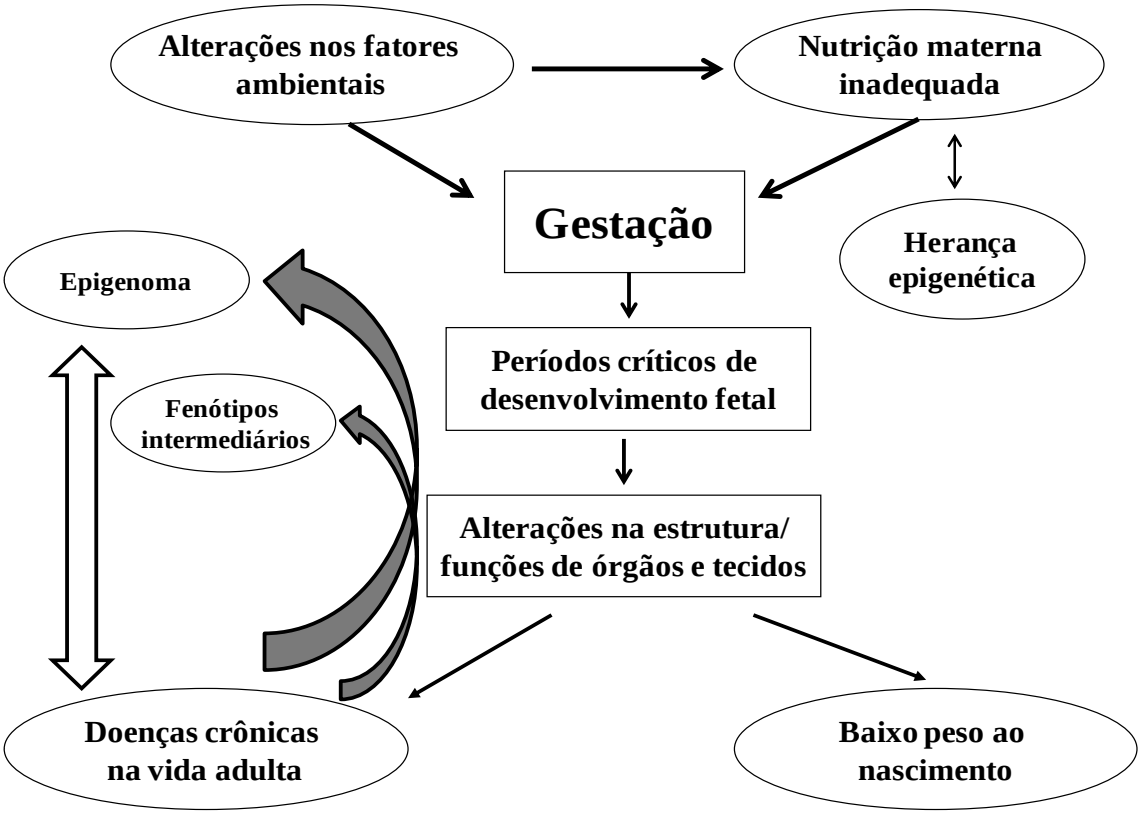


Figura 3: Representação esquemática da influência dos eventos adversos ocorridos ainda *in utero* sobre a progressão de doenças metabólica na prole

2 OBJETIVO GERAL

No presente trabalho o objetivo foi verificar os efeitos que ocorrem nas proles em resposta ao consumo de dieta hipossódica restrita ao período gestacional. Verificar em qual fase da gestação, as consequências do consumo reduzido de sal se manifestam na prole ao nascimento e na idade adulta, além de investigar a contribuição da metilação gênica em resposta ao consumo de dieta hipossódica materna como possível mecanismo epigenético responsável por alteração fenotípica da prole.

2.1 Objetivos específicos

1. Determinar em qual período gestacional, a dieta hipossódica materna é responsável pelo baixo peso ao nascimento da prole.
2. Avaliar os efeitos da ingestão da dieta hipossódica materna na prole sobre:
   - a resposta glicêmica em teste de tolerância à glicose e à insulina intraperitoneal em prole adulta.
   - as concentrações séricas de glicose, insulina ao nascimento e na idade adulta e peptídeo-C, leptina e IGF-1 somente na idade adulta.
3. Avaliar os níveis de expressão de mRNA dos genes *Ins1*, *Ins2*, *Insr*, *Lep*, *Lepr*, *Igf1* e *Igf1r* em tecidos alvos da insulina como fígado, músculo gastrocnêmio e tecido adiposo retroperitoneal nas proles neonatal e adulta.
4. Avaliar o grau de metilação do DNA na região promotora dos genes e tecidos citados acima nas proles ao nascimento e na idade adulta.

3 MÉTODOS

Os experimentos realizados neste projeto foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – CAPPesq (protocolo de aprovação 0949/09).

3.1 Animais

Ratos machos e fêmeas Wistar provenientes do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com oito semanas de idade, pesando aproximadamente 200 – 250g, foram mantidos em gaiolas de plástico, em condições controladas de temperatura (22ºC), com ciclos claro-escuros fixos de 12 horas e receberam ração comercial Nuvilab CR-1 (Nuvital – Colombo, PR - Brasil) e água *ad libitum*.

3.2 Protocolo experimental

Grupo materno

Ao completarem doze semanas de vida, as ratas foram acasaladas com ratos machos Wistar adultos. O início da gestação foi determinado pela presença de espermatozoides no esfregaço vaginal avaliado diariamente (Figura 4). A dieta foi trocada em diferentes tempos gestacionais para a dieta normossódica (NR – 1,3% NaCl e 25% de proteína, Harlan Teklad, Madison, WI - EUA) ou para a dieta hipossódica (HO – 0,15% NaCl e 25% de proteína, Harlan Teklad, Madison, WI - EUA) de acordo com o protocolo experimental (Figura 5).

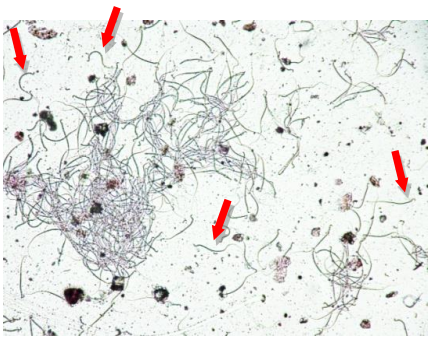


Figura 4: Esfregaço vaginal evidenciando a presença de espermatozoides indicado pelas flechas (200x)

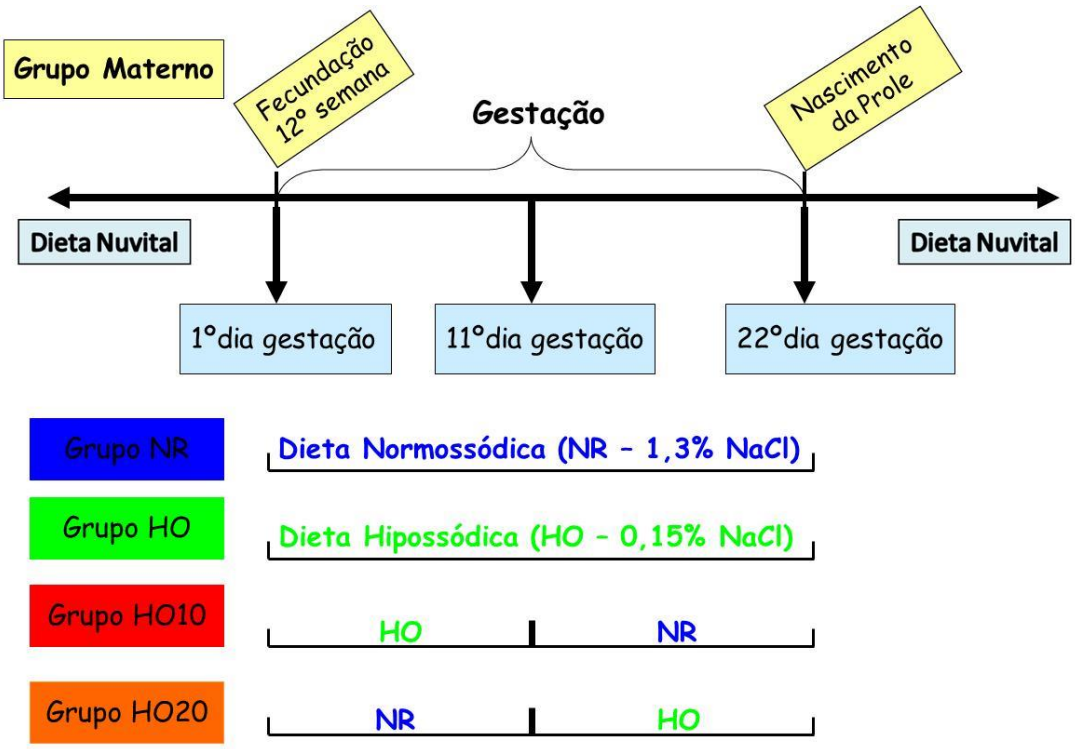
O grupo materno foi dividido em quatro grupos de acordo com a descrição e a figura 5.

Grupo NR: recebeu dieta NR durante todo período gestacional.

Grupo HO: recebeu dieta HO durante todo período gestacional.

Grupo HO10: recebeu dieta HO a partir do primeiro dia de gestação até o décimo dia de gestação. Do décimo primeiro dia de gestação até o nascimento da prole as mães receberam dieta NR.

Grupo HO20: recebeu dieta NR do primeiro dia de gestação até o décimo dia de gestação no qual passou a receber dieta HO até o nascimento da prole.



Dieta Normossódica – NR – 1,3% NaCl e 25% de proteína

Dieta Hipossódica – HO – 0,15% NaCl e 25% de proteína

Dieta Nuvital – mínimo de 0,7% NaCl e mínimo 22% de proteína

Figura 5: Protocolo experimental do grupo materno

A dieta de 0,15% NaCl foi escolhida como dieta hipossódica por apresentar o mínimo necessário para uma reprodução com sucesso (0,08% NaCl). Quantidades abaixo desse valor conduzem a altos níveis de mortalidade (Bird & Contreras, 1987).

As ratas foram pesadas semanalmente e o consumo alimentar e hídrico foi avaliado durante todo período gestacional.

Após o nascimento, independente do grupo materno, as ratas receberam a ração comercial nacional (Nuvital – Colombo, PR - Brasil). No final da lactação as mães foram separadas da prole e no dia seguinte foram eutanasiadas por decapitação através do uso da guilhotina.

Grupo prole

Após o nascimento da prole, o peso corpóreo e o comprimento naso-anal dos neonatos foram avaliados. O tamanho da ninhada foi reduzido para cinco fêmeas e cinco machos, sempre que possível. A seleção dos neonatos que foram mantidos com as mães e dos que foram excluídos foi realizada de maneira que a média dos pesos entre os animais que permaneceram e os que foram excluídos fosse semelhante. Os neonatos excedentes foram eutanasiados por decapitação e o sangue destes foi coletado como *pool* devido à quantidade muito pequena de cada neonato para posterior dosagem bioquímica. O coração, fígado, rim, suprarrenal e pâncreas foram coletados e pesados para posterior realização da expressão gênica. Ao atingir a terceira semana de vida, as proles foram desmamadas e receberam ração comercial (Nuvital) independente da dieta materna.

O peso corpóreo da prole foi medido semanalmente desde o nascimento até completarem doze ou vinte semanas de vida, quando então foram realizados os testes e a eutanásia por decapitação. O consumo alimentar e hídrico foi medido semanalmente por gaiola. Ao completarem doze e vinte semanas de idade foi medida a glicemia em jejum de seis horas e coletado sangue para as análises bioquímicas. O sangue coletado foi centrifugado a 4ºC, 3000 rpm por 15 minutos e separado o soro. O soro foi armazenado em microtubos em freezer -20ºC. As amostras de soro foram utilizadas para a determinação de insulina, leptina, IGF-1 e peptídeo-C. Teste de tolerância à glicose (GTT) e o teste de tolerância à insulina (ITT) foram realizados nos animais com doze e vinte semanas de vida (Figura 6).

Após o GTT e ITT os animais com doze ou vinte semanas de vida foram eutanasiados por guilhotina e o coração, rim, fígado, as suprarrenais, o músculo gastrocnêmio, o tecido adiposo gonadal, retroperitoneal, mesenquimal, inguinal, foram imediatamente retirados, separados, pesados e congelados em nitrogênio liquido em recipiente livre de RNAse e armazenados em freezer -80°C para posterior realização das análise de expressão gênica e metilação do DNA genômico.

A obesidade foi avaliada através do índice de adiposidade utilizando a seguinte equação: soma da massa dos tecidos adiposos brancos (g) / massa corpórea (g) x 100. Os tecidos adiposos brancos utilizados para calcular a soma foram o tecido adiposo gonadal, inguinal, mesentérico e retroperitoneal.

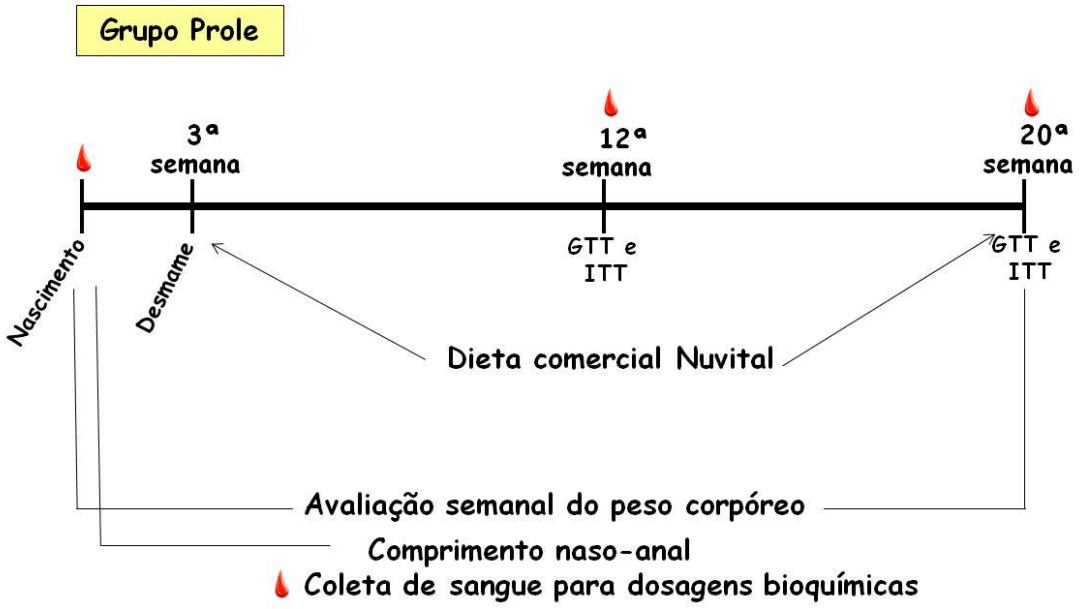


Figura 6: Protocolo experimental do grupo prole

3.3 Medida do peso corpóreo e comprimento naso-anal

A medida do peso corpóreo foi realizada por meio de balança digital específica para pesagem de animais (modelo AS500, Marte Balança - SP, Brasil). O comprimento naso-anal foi realizado com régua de plástico com escala milimétrica e centimétrica.

3.4 Determinações bioquímicas

3.4.1 Determinação da insulina, leptina, glicemia, peptídeo-C e IGF-1

A glicemia foi determinada em amostras de sangue obtidas por punção da veia caudal após jejum de seis horas por meio de tiras reativas (Accu-Chek Active, Roche Diagnóstica - SP, Brasil) analisadas em glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche Diagnóstica - SP, Brasil) com limite de detecção de 10 a 600 mg/dL.

As dosagens séricas de insulina, leptina e peptídeo-C foram realizadas pelo método de radioimunoensaio através de kits específicos para rato da marca Millipore (Millipore Corporation, Billerica MA – EUA. Rat Insulin Cat.#RI-13K; Rat Leptin Cat.#RL-83K, Rat C-Peptide Cat.#RCP-21K). A dosagem sérica de IGF-1 foi realizada pelo método de imunoensaio que utiliza microesferas conjugadas a um anticorpo especifico. Esse ensaio se fundamenta no método "sanduiche" convencional de dois-sítios, onde as microesferas são primeiramente incubadas com os padrões e amostras seguido da adição do anticorpo de detecção biotinilado. O resultado final é amplificado através da incubação com o conjugado repórter estreptavidina-ficoeritrina. A estreptavidina-ficoeritrina se liga ao repórter biotinilado e emite sinal fluorescente. A fluorescência é lida no equipamento *Luminex* através de sistema duplo de lasers que incide sob as microesferas, à medida que estas fluem através do fluxo celular. Um feixe de laser detecta a microesfera e o outro laser quantifica o sinal de repórter em cada microesfera (Millipore Corporation, Billerica MA – EUA. Milliplex Rat/Mouse IGF-1 Cat.#RMIGF18K; Luminex xMAP).

3.4.2 Teste de tolerância à glicose intraperitoneal (GTT) e teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ITT)

Testes de tolerância à glicose e insulina foram realizados em animais com doze e vinte semanas de idade. Os testes foram realizados com os animais acordados. No GTT a comida foi retirada 12 horas antes do início do experimento e água oferecida à vontade. A amostra de sangue foi obtida através de uma pequena incisão no final da cauda e a concentração de glicose determinada com glicosímetro. A glicemia basal foi avaliada antes do início do experimento e, em seguida, uma solução de glicose 20% (1mg/kg de peso corpóreo) foi administrada intraperitonealmente. As glicemias foram

determinadas nos tempos 5, 15, 30, 60, 90 e 120 minutos em sangue coletado por incisão caudal.

Dois ou três dias após o GTT o teste de tolerância à insulina (ITT) foi realizado. Para tanto a comida foi retirada seis horas antes do início do experimento e água foi oferecida à vontade. A glicemia basal dos animais foi avaliada e então administrada uma solução de insulina (1,5U/kg) intraperitonealmente e a glicose sanguínea avaliada nos tempos 15, 30, 45, 60, 75 e 90 minutos também em sangue obtido por meio de incisão caudal. Logo após o término do teste, uma solução de glicose 5% foi administrada intraperitonealmente para evitar hipoglicemia.

3.5 Cálculo do índice de HOMA (*Homeostasis Model Assessment*)

O modelo homeostático de resistência insulínica (HOMA-IR) é uma avaliação de sensibilidade à insulina pela medida da glicemia e insulina de jejum. O índice HOMA-IR foi calculado para avaliar a sensibilidade à insulina nos ratos com doze e vinte semanas de idade. Seu cálculo foi feito pela multiplicação do valor da glicemia de jejum (mmol/L) pelo valor da insulinemia de jejum (µU/L) o resultado deste produto foi dividido pelo valor da constante 22,5 (Matthews et al., 1985).

3.6 Extração, purificação e integridade do RNA total

O RNA total dos tecidos (fígado, tecido adiposo branco retroperitoneal e músculo gastrocnêmio) foi isolado utilizando-se Trizol® (Invitrogen Brasil Ltda., São Paulo, Brasil). Neste método a extração é feita com tiocianato de guanidina/ fenol/ clorofórmio na relação de 1mL de Trizol® para cada 50mg de tecido homogeneizado (Chomczynski et al 1987). Após a homogeneização da amostra o homogenato foi incubado por 5 minutos a temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Em seguida 200µL de clorofórmio foi adicionado seguido de centrifugação a 14.000 rpm por 15 minutos à 4ºC e a fase aquosa foi separada. Após esta etapa, adicionou-se 500µL de álcool isopropílico e depois de nova centrifugação, o sobrenadante foi então lavado com

etanol 75% gelado e o precipitado resultante foi eluído em 50µL de água tratada com DEPC. A concentração do RNA foi determinada pelo espectrofotômetro *Nano Drop 1000* (Thermo Scientific) em absorbância a 260nm. Após medição da densidade óptica (DO) [RNA = (DO x 40 x diluição) µg/mL] o grau de pureza do RNA foi estimado pela relação absorbância 260nm/ absorbância 280nm (contaminação com proteína) e absorbância 260nm/ absorbância 230nm (contaminação com compostos fenólicos), sendo consideradas amostras com pureza satisfatórias as que obtiveram razões 260/280 próximas de 2,0 e 260/230 entre 1,8 e 2,2. A integridade do RNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, produzindo um padrão de bandeamento, sendo visíveis pela exposição à luz ultravioleta duas bandas 28S e 18S de RNA ribossomal. As amostras de RNAs extraídas foram armazenadas a -80ºC.

3.6.1 Síntese do cDNA

A partir do RNA total extraído foram sintetizados os cDNA pelo método da transcriptase reversa. Inicialmente, alíquotas de 1µg de RNA total foram incubadas por 5 minutos a 70ºC com 1µL de Oligo dT (150ng/µL, Promega Corporation, Madison, EUA) acrescido de água Milli-Q para volume final de 5µL, para desnaturação das cadeias e imediatamente resfriadas a 4ºC por 5 minutos e mantidas no gelo. Em seguida, foram adicionados 15µL de uma solução contendo 4µL de tampão 5x concentrado da enzima Improm-II Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, EUA), 2,4µL de $MgCl_2$ (25mM, Life Technologies), 1µL de dNTP mix (10mM, Life Technologies), 1µL da enzima Improm-II Reverse Transcriptase (Promega Corporation, Madison, EUA) e 6,6µL de água Milli-Q, para um volume final de reação de 20µL. As amostras foram incubadas à 25ºC por 5 minutos e posteriormente, à 42ºC por 1 hora, para a síntese de cDNA. Em seguida, a enzima transcriptase reversa foi inativada por meio da incubação das amostras à 70ºC por 15 minutos. Nas duas etapas foi utilizado o termociclador (DNA Engine, Massachusetts, EUA). As amostras foram armazenadas em freezer -20ºC, as quais posteriormente foram utilizadas para quantificar a expressão gênica por meio do PCR quantitativo.

3.6.2 Desenho e concentração dos oligos (*primers*)

Com o auxílio do programa computacional *Oligo Analyzer* versão 3.1 (http://www.idtdna.com) foram desenhados os oligos iniciadores (*primers*) sense (*forward*) e anti-sense (*reverse*) que foram utilizados na amplificação dos genes expressos nos experimentos de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). Todos os *primers* foram analisados no programa BLAST (http//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para certificar que eles não amplificariam produtos inespecíficos. As sequências dos *primers* utilizados estão listadas na tabela 1.

3.6.3 Reação de RT-PCR quantitativo

Utilizou-se o corante SYBR Green (Qiagen, Hilden, Alemanha) para a reação de RT-PCR quantitativo. Este corante devido a sua afinidade ao se intercalar na dupla fita do DNA apresenta intensidade de emissão de fluorescência significativamente aumentada na ordem de mil vezes, permitindo assim a detecção do produto da PCR em tempo real.

A PCR em tempo real foi utilizada para quantificação relativa (PCR em tempo real quantitativa, qRT-PCR). As reações qRT-PCR foram realizadas utilizando-se o kit Rotor-Gene SYBR Green PCR (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as reações foram realizadas em duplicata, no termociclador Rotor-Gene Q 2 plex HRM (Qiagen, Hilden, Alemanha).

Para a análise inicial dos dados gerados durante a amplificação foi utilizado o programa Rotor-Gene Q Series Software versão 2.1.0.

O programa analisa e associa a intensidade de fluorescência e o número de ciclos da reação e caracteriza sob a forma de gráfico quando a reação se torna linear. O número do ciclo em que a intensidade de fluorescência é superior ao sinal de ruído (*background*), corresponde ao Ct (*cycle treshold*). Desta forma, para a determinação do Ct de cada reação foi determinado manualmente um ponto de corte (*threshold*) para cada *primer*. Para tanto, o valor de Ct do gene de interesse foi comparado com o Ct de do gene referência (ou endógeno 18S ribosomal RNA) que possibilitou a normalização do resultado quando ocorre variabilidade na quantidade de mRNA ou mesmo de condições experimentais.

O modelo matemático utilizado para a determinação relativa da expressão gênica é dado pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak et al., 2001). Como calibrador foi utilizado como o *pool* de cada tecido das proles de machos e fêmeas do grupo NR. E os dados apresentados com a variação na expressão dos genes normalizados a um gene endógeno de referência e em relação ao calibrador não tratado.

O cálculo foi realizado a partir dos valores de Ct, da seguinte forma:

ΔCt = Média do gene alvo (das duplicatas) – Média do gene endógeno (das duplicatas); ΔΔCt = ΔCt (amostra de interesse) – ΔCt (amostra de referência).

Foi calculada a diferença entre os valores de Ct do gene em estudo e do controle endógeno para cada amostra (ΔCt). Em seguida, foi calculada a média de ΔCt entre as amostras controle do experimento (calibrador) e calculada a diferença entre os valores de ΔCt de cada amostra e o valor médio de ΔCt das amostras controle (ΔΔCt). O valor relativo de cada amostra foi obtido pela expressão $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Tabela 1: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para quantificação da expressão gênica através de ensaios de RT-PCR quantitativo (F: *forward*, R: *reverse;* Tm: temperatura de *melting*)

Nome oficial dos genes	**Sequência 5'- 3'**	**Tm (ºC)**	**Tamanho (bp)**
Insulin1	F: GGGAACGTGGTTTCTTCTACA R: CAGTGCCAAGGTCTGAAGAT	60	116
Insulin2	F: GTCAAACAGCACCTTTGTGG R: GGACATGGGTGTGTAGAAGAAT	60	87
Insulin receptor	F: CTGGACAGAACCCACCTATTT R: CTGAAGAGGAAGACGAAGATGAG	60	102
Leptin	F: GAGCGCAGGCTAGGTTATTATG R: TTCTCTCTCCCTCTGACACATC	60	101
Leptin Receptor	F: GGTTGGATGGACTAGGGTATTG R: CAGAATTCAGGCCCTCTCATAG	60	94
Insulin-like growth factor 1	F: GCGTGGGTAGATTGCTGTTA R: GAGGCAGGGACTAGGAGATATAA	60	91
18S ribosomal RNA	F: GCCGCTAGAGGTGAAATTCT R: TCGGAACTACGACGGTATCT	60	129

3.7 Avaliação da metilação do DNA

Para avaliação do grau de metilação do DNA nas regiões promotoras dos genes, primeiramente foi realizado a extração do DNA dos tecidos, seguido pelo tratamento de bissulfito de sódio, a amplificação da região de interesse com marcação por biotina na região 5' e posteriormente realizado o pirosequenciamento.

3.7.1 Extração do DNA genômico (gDNA)

A extração e purificação do DNA genômico dos tecidos hepático, adiposo branco retroperitoneal e músculo gastrocnêmico utilizados neste trabalho foi realizada utilizando-se colunas de sílica e métodos disponibilizados pelo *DNeasy Blood & Tissue Kit*® (Qiagen, Hilden, Alemanha). Para isolar o gDNA do tecido adiposo retroperitoneal (TAR) foi utilizado 50mg e 25mg para os demais tecidos estudados conforme instruções do fabricante. O gDNA isolado foi quantificado pela densidade óptica de absorbância a 260nm no espectrofotômetro *NanoDrop 1000* (Thermo Scientific). A presença de contaminantes, proteínas e fenol, foi avaliada no mesmo aparelho através da determinação das razões de absorbância nos comprimentos de onda de 280nm e 230nm, respectivamente, sendo consideradas amostras com pureza satisfatórias as que obtiveram razões 260/280 próximas de 2,0 e 260/230 entre 1,8 e 2,2 [DNA = (DO x 50 x diluição) µg/mL].

3.7.2 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O *status* da metilação de uma sequência do DNA pode ser determinado utilizando-se o tratamento com bissulfito de sódio, sendo essa etapa crítica para determinar corretamente o grau de metilação do DNA.

A incubação do DNA com o bissulfito de sódio elimina o grupo amina da citosina não metilada (desaminação) convertendo-a em uracila (posteriormente substituídas por timinas durante a síntese de uma nova fita de DNA). Já a citosina metilada é mantida intacta (permanecendo citosina após a reação de amplificação) (Figura 7). Essa conversão é alcançada pela incubação do DNA com altas concentrações de sal de bissulfito, temperatura elevada e baixo pH. A reação foi realizada com a utilização do *Epitec Bisulfite kit*® (Qiagen, Califórnia, EUA) de acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante.

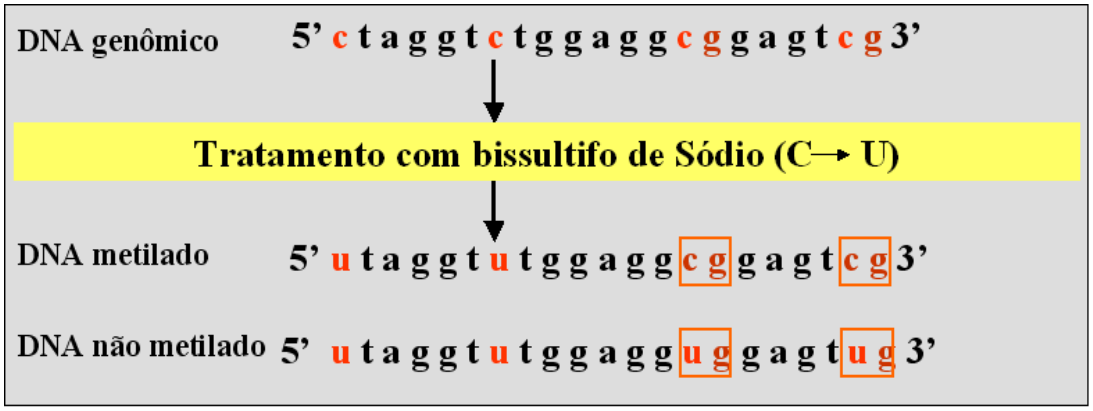


Figura 7. Esquema da conversão da sequência do DNA pela ação do bissulfito de sódio

3.7.3 Desenho dos oligos iniciadores (*primers*) para PCR e Pirosequenciamento

Com o auxílio do programa *PyroMark Assay Design* (Qiagen, Hilden, Alemanha), foram desenhados os *primers forward* e *reverse* às CpGs presentes nas regiões promotoras de cada gene e uma sonda de sequenciamento (Tabela 2). Seguindo três passos: primeiramente, através do programa *Ensembl Genome* (http://useast.ensembl.org) o gene de interesse foi selecionado e a sequência genômica original obtida foi copiada no *PyroMark Assay*. O programa já converte a sequência original em sequência pós-tratamento com bissulfito, identifica todas as ilhas CpGs e apresenta possíveis controles de conversão de bissulfito. O segundo passo foi selecionar a região de interesse com as ilhas CpGs e por último escolher os *primers* pela melhor pontuação que o programa apresenta. Um dos *primers* da PCR (*forward* ou *reverse*) é biotinilado na extremidade 5', de acordo com as especificações do programa.

O gene *Igf1r* foi escolhido através do programa *Gene Globe* (Qiagen, Califórnia, EUA), para ensaios de metilação de DNA (Número do catalogo 978746).

As sequências utilizadas dos *primers* utilizados neste estudo estão listadas na tabela 2.

3.7.4 PCR pós-tratamento com o bissulfito de sódio

Nas reações de PCR pós-tratamento com o bissulfito de sódio a citosina não metilada primeiramente convertida em uracila é substituída por timina durante a síntese

de uma nova fita de DNA. Já a citosina metilada é mantida intacta, permanecendo citosina após a reação de amplificação (Figura 8).

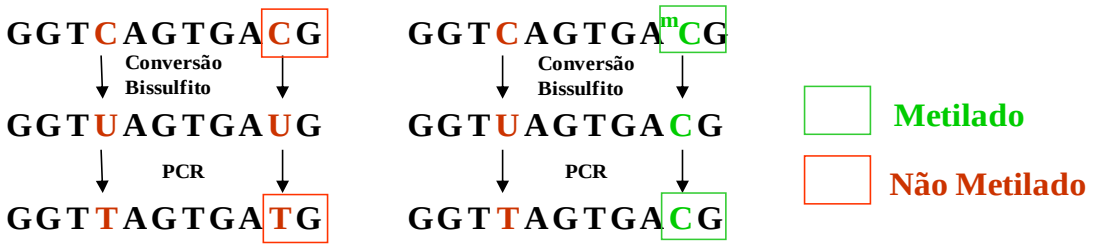


Figura 8: Exemplificação da conversão da sequência do DNA pela ação do bissulfito de sódio em ilha CpG metilada e não metilada precedida pela reação de amplificação – PCR

Para padronização dos ensaios de PCR foram utilizados inicialmente os *primers* sem a biotina dos genes *Ins1, Ins2, Insr, Lep, Lepr* e *Igf1*. Depois de padronizados os produtos da PCR confirmados pelo gel de eletroforese 1% realizaram-se então as amplificações das regiões de interesse agora com os *primers* biotinilados.

Foi realizado o *touchdown PCR* para amplificação dos produtos, com o objetivo de aumentar a especificidade da reação de PCR. Este tipo de reação utiliza nos ciclos iniciais da PCR temperaturas de anelamento e extensão alguns graus acima da temperatura de *melting* (Tm) dos *primers*. Embora o anelamento dos *primers* seja menos eficiente nessas condições, ele é mais específico o que permite a acumulação de produto específico no início da reação, que será utilizado como molde nos ciclos subsequentes, realizadas em temperatura mais baixas (Tm dos *primers*).

A reação de PCR foi realizada com 1 unidade da enzima *Taq DNA Polymerase* (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), 0,2 µM de dNTP, 5 pmol/µL de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1 x Accu Taq LA buffer (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e 5 µL do DNA (*template*). O volume de 20 µL da reação foi transferido para o termociclador (DNA Engine, Massachusetts, EUA) nas seguintes condições: 3 minutos a 95ºC, seguido de 5 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 62ºC (5ºC maior que a Tm, portanto esse valor teve variação dependendo do gene: *Ins1* e *Lepr* 66º C; *Ins2* 64ºC; *Insr* e *Lep* 63ºC e *Igf1* 62ºC), 30 segundos a 72ºC; 45 ciclos de 30 segundos a 95ºC, 30 segundos a 57ºC (dependendo da Tm: *Ins1* e *Lepr* 61º C; *Ins2* 59ºC; *Insr* e *Lep* 58ºC e *Igf1* 57ºC), 30

segundos a 72ºC, seguido de 5 minutos a 72ºC. A temperatura de hibridização varia de acordo com o *primer* utilizado. Para cada gene, foi feito um gradiente de temperatura, a fim de selecionar a temperatura ideal para a hibridização do *primer* da fita de DNA.

Para verificação da correta amplificação dos produtos, 5µL do produto de cada reação foi submetido à eletroforese em gel de 1% em TBE com 0,5µg/mL de brometo de etídio. O ensaio da PCR do gene *Igf1r* (NM_052807) foi realizado seguindo as recomendações do fornecedor (Qiagen, Hilden, Alemanha).

3.7.5 Pirosequenciamento

O pirosequenciamento foi utilizado para análise do grau de metilação do DNA que explora de maneira quantitativa o *status* de metilação resultado da proporção de citosina para timina em cada CpG analisado. Além disso, as ilhas CpG são analisadas de forma independente dentro de uma mesma corrida. Estas características têm estabelecido o método de pirosequenciamento como padrão-ouro para a análise da metilação do DNA.

O método se baseia na amplificação pela PCR da região desejada com marcação por biotina na região 5'. O produto da PCR é desnaturado e o segmento marcado com biotina serve de molde para o pirosequenciamento, após ser isolado, pela propriedade de ligação biotina-estreptavidina, que hibridiza com o *primer* do sequenciamento. O *primer* hibridado e o molde fita simples são incubados com as enzimas DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase, assim como os substratos adenosina 5-fosfosulfato (APS) e luciferina. O primeiro deoxiribonucleotideo trifosfato (dNTP) é adicionado na reação. A DNA polimerase catalisa a adição do dNTP ao *primer* do sequenciamento, se ele for a base complementar da fita molde. Cada incorporação é acompanhado pela liberação de pirofosfato (PPi) na quantidade equimolar para a quantidade de nucleotídeo incorporado. A ATP sulfurilase converte o PPi para ATP na presença de APS. Este ATP direciona a conversão mediada pela luciferase da luciferina para oxiluciferina que gera luz visível em quantidade proporcional à quantidade de ATP. A luz produzida na reação catalisada pela luciferase é detectada por um sensor visto como um pico nos dados brutos liberados (pirograma). A altura de cada pico (sinal de luz) é proporcional ao número de nucleotídeo incorporado. A apirase continuamente degrada os nucleotídeos não incorporados e ATP. Quando a degradação é completa,

outro nucleotídeo é adicionado. A adição de dNTPs ocorre sequencialmente. É importante ressaltar que a deoxiadenosina alfa tio trifosfato (dNTPαS) é usado como um substituto do deoxiadenosina trifosfato (dATP), pois este é eficientemente utilizado pela DNA polimerase, mas não reconhecido pela luciferase. No processo continuo a fita complementar do DNA é polimerizada e a sequência do nucleotídeo é determinada pelo sinal do pico no traçado do pirograma. Fundamento do método do pirosequenciamento segundo manual do equipamento Q24 da Qiagen (www.qiagen.com) (Figura 9).

Foi utilizado o aparelho de pirosequenciamento (PyroMark Q24 – Qiagen, Hilden, Alemanha) do laboratório do Professor Doutor Mario H. Hirata do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia do Estado de São Paulo e a análise de metilação foi realizada através do software PyroMark CpG SW 1.0.

Para realização do pirosequenciamento o produto da PCR biotinilada (*template*) deve ser imobilizado em esferas revestidas com estreptavidina. Primeiramente, é realizado um *master mix*: 40µL de *binding buffer* (Qiagen), facilitando a ligação da biotina com as esferas, 30µL de água DEPEC, componente utilizado para completar o volume final da reação, 2µL de esferas *Streptavidin Sepharose* (GE Healthcare Bio Sciences, Uppsala, Suécia) que se ligam na biotina. Este *master mix* é distribuído nas placas de PCR sendo adicionado 10µL do produto da PCR (biotinilada). A placa é selada e agitada constantemente durante 10 minutos, pois as esferas sedimentam rapidamente. O pirosequenciamento é realizado com o DNA de fita simples, portanto, é realizada uma purificação através de um sistema de vácuo. Este sistema possui filtros nas pontas do cabeçote (*probes*) para adesão das esferas ligadas na fita de DNA marcada com biotina. Após o acionamento do vácuo, as esferas contendo o *template* imobilizado são capturadas e ficam ligadas no filtro e o restante do produto da PCR é descartado. Logo em seguida em uma *workstation*, as *probes* são imersas em ordem nas seguintes soluções: etanol 70% (para precipitação do DNA) por aproximadamente 5 segundos, solução de desnaturação do DNA (hidróxido de sódio, NaOH) por 5 segundos, em *wash buffer*, tampão que descarta a fita de DNA não biotinilada por 10 segundos (Figura 10). A partir desta etapa o DNA já é fita simples e é hibridizado com 0,3µM do *primer* de sequenciamento (complementar ao *primer* biotinilado) aquecido a 80ºC por 2 minutos. A placa é posicionada no PyroMark Q24 para realização do pirosequenciamento, na presença de enzimas, substrato e nucleotídeos (PyroMark Q24 Gold Kit – Qiagen) que são adicionados em um cartucho específico do equipamento.

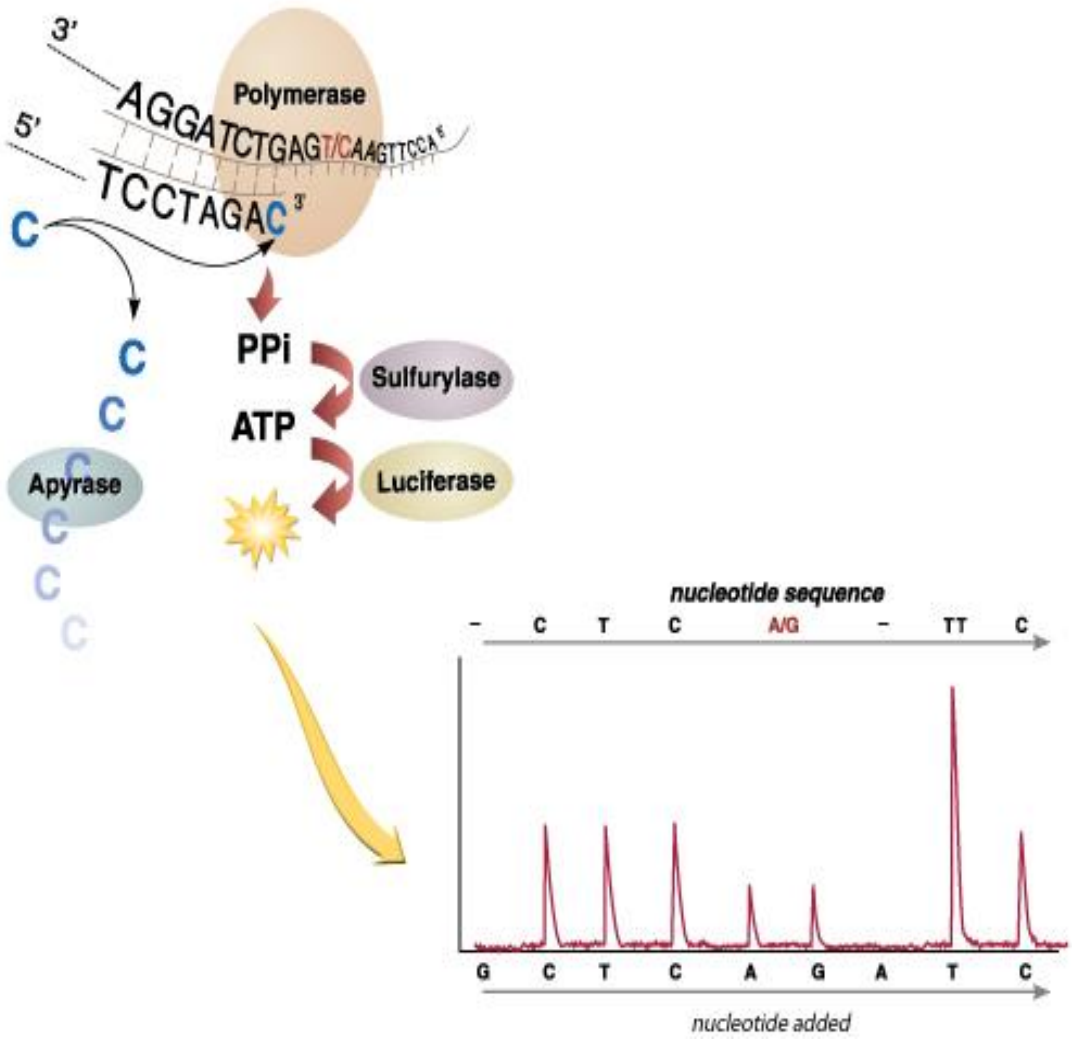


Figura 9: Representação da reação enzimática do pirosequenciamento. O pirosequenciamento é o sequenciamento do DNA no qual uma cascata de reações enzimáticas produz luz detectável que é proporcional à incorporação de nucleotídeos. A cascata enzimática do pirosequenciamento é composta por quatro enzimas: DNA polimerase, ATP sulfurilase, luciferase e apirase. O pirosequenciamento começa com a incorporação de um nucleotídeo na fita de DNA, realizada pela DNA polimerase. Esta incorporação libera um pirofosfato inorgânico (PPi) que é convertido em ATP pela enzima ATP sulfurilase fornecendo energia para a luciferase oxidar a luciferina presente na reação e então gerar luz que é detectável pelo equipamento. Esta luz é representada por picos e analisada em tempo real. Fundamento de método do pirosequenciamento segundo manual do equipamento Q24 da Qiagen (www.qiagen.com)

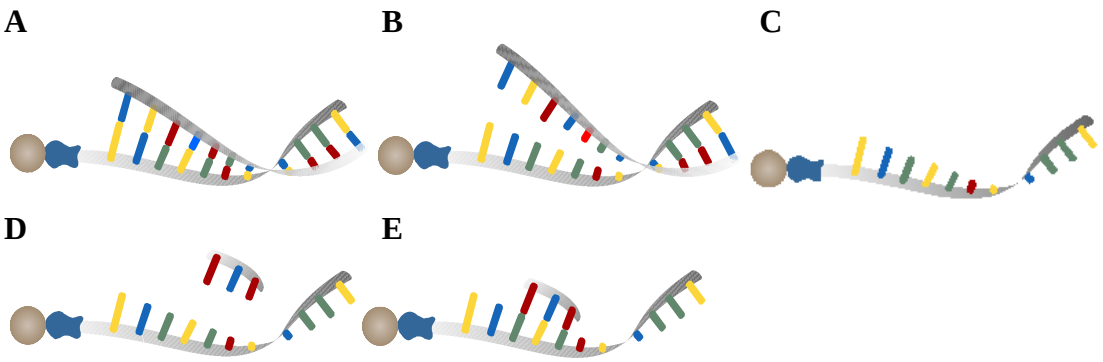


Figura 10: Preparação da amostra para a reação de pirosequenciamento. (A) O produto da PCR imobilizada contendo as esferas revestidas por estreptavidina; (B) As fitas do DNA são separadas por desnaturação em solução de hidróxido de sódio (NaOH); (C) Lavagem e neutralização da fita imobilizada; (D e E) Anelamento do *primer* de sequenciamento

Tabela 2: Sequência dos oligos iniciadores (*primers*), sense (*forward*) e anti-sense (*reverse*) utilizados para PCR e pirosequenciamento. Um dos *primers* da PCR (*forward* ou *reverse*) é biotinilado na extremidade 5'

Nome Oficial	Símbolo Oficial	ID do Gene		Primer 5'- 3'	Posição 5'-3'
Insulin1	*Ins1*	24505	Forward	TAGGGGGAGTTTTGGATTGAAT	71-92
			Reverse – biotina	ACCCAACCCTACCCTACAAT	268-249
			Sequência (2-5)	AGTTATTAGTTTAAGGGA	119-136
Insulin2	*Ins2*	24506	Forward	AGTTGTGGGAGGGGAGTA	544-561
			Reverse – biotina	ATCCCCCAACACCTCCTA	742-725
			Sequência (36-39)	GGAGGGGAGTAGGTT	551-565
Insulin receptor	*Insr*	24954	Forward	GTTAGGGGAAGTATTTTGGTGAGTT	641-665
			Reverse - biotina	CACAAACCTCCACTACAAACAACACTAT	762-735
			Sequência (45-48)	GGTGAGTTTTGGATTTT	658-674
Leptin	*Lep*	25608	Forward	GGATTTAGATTTTTAGTGGGAGAGGA	19-44
			Reverse - biotina	CTCCCTATAATCTACCCTTCTCT	208-186
			Sequência (2-4)	GATTTTAATAGATATAATAAGAGGT	69-93
Leptin receptor	*Lepr*	24536	Forward	TTTATGGGTTGGAGGTAGGATTGT	231-254
			Reverse - biotina	ACCCTACAAACACTCAACATTTC	365-343
			Sequência (18-23)	TGTGTTAGAGTGGGG	354-268
Insulin-like growth factor 1	*Igf1*	24482	Forward - biotina	AGTTTTGAGGAAAGTTAATTAGAGAATAGA	401-430
			Reverse	CCTCACATTTATCTACAAAACAC	681-659
			Sequência (11-14)	ACAAAAAACAACTAAAAAAACATTC	647-623

3.8 Análise Estatística

Primeiramente, a normalidade dos dados foi analisada pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov e/ou Shapiro-Wilk*. Nas variáveis que não apresentaram distribuição normal *Gaussiana* utilizou-se o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido do pós-teste de *Dunns* para comparação de três ou mais grupos. Os resultados para as variáveis não paramétricas foram representadas pela mediana (25º percentil; 75º percentil). Para as variáveis que apresentaram distribuição normal utilizou-se análise de variância de um fator (*one-way* ANOVA) para comparar as diferenças das médias dos resultados obtidos de três grupos ou mais grupos, seguida do pós-teste de *Tukey* ou *Newman-Keuls.* Também foi utilizada a análise de variância de dois fatores (*two-way* ANOVA) seguida do pós-teste de *Bonferroni* para avaliar peso da prole ao longo do tempo. O teste do *Chi-quadrado* foi utilizado para comparar frequência dos óbitos de neonatos. A inclinação da curva de glicemia durante o ITT foi calculado por regressão linear. A área sob a curva (AUC) foi calculada para o GTT. Para as análises de correlação entre duas variáveis foi utilizado o teste de *Pearson*. Os resultados de variáveis com distribuição normal foram expressos como média ± erro padrão da média. O programa utilizado para as análises estatísticas foi o *Graph Pad Prism* versão 5.01 (GraphPad Software, Inc, Califórnia, EUA). Foi adotado como nível de significância estatística o valor de erro alpha de 0,05.

4. RESULTADO

4.1 Grupo Materno

Todas as dietas utilizadas neste estudo permitiram reprodução, crescimento e tamanho normal da prole.

4.1.1. Consumo de ração e ingestão hídrica materna

O consumo de dieta foi avaliado semanalmente (g.sem^{-1}.rato^{-1}). Na primeira (NR 143±10; HO 169±8; HO10 162±11; HO20 154±7) e segunda semanas de gestação (NR 148±9; HO 165±6; HO10 175±7; HO20 163±5) não houve diferença do consumo entre os grupos. Na terceira semana de gestação o consumo de dieta do grupo HO10 (165±8) foi maior comparado ao grupo HO20 (132±6). (NR 146±5) e HO (146±11) (Figura 11).

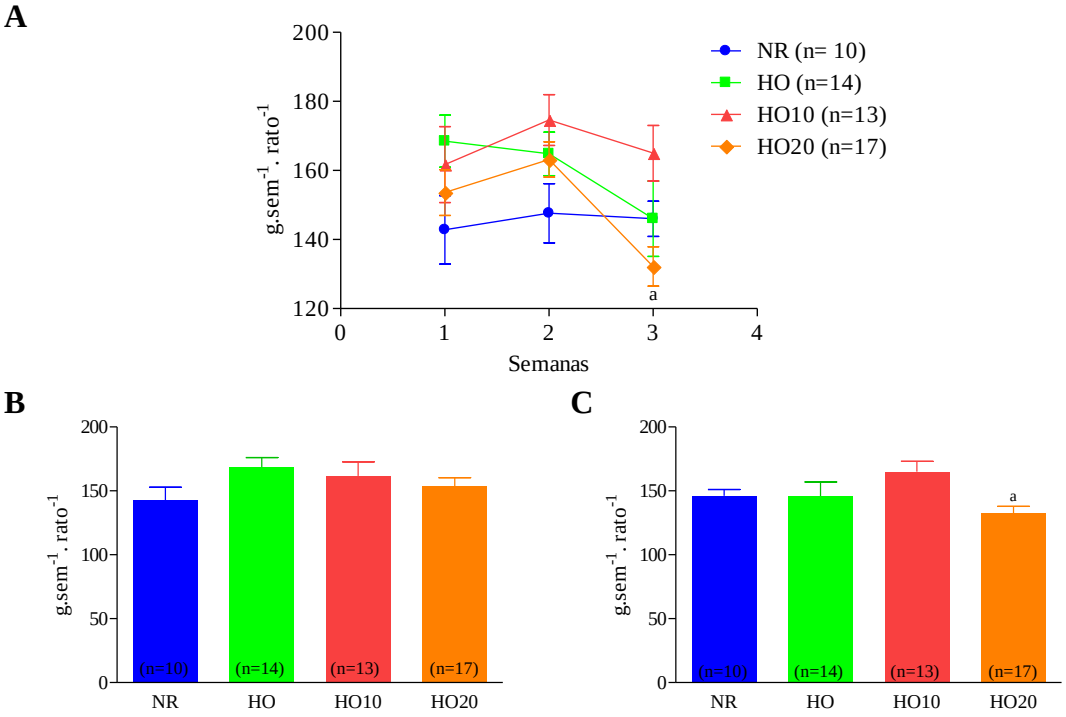


Figura 11: Consumo de ração materna durante a gestação. Consumo de ração avaliado do primeiro dia de gestação até o nascimento da prole, representado semanalmente (A). Consumo de ração na primeira semana de gestação (B) e consumo de ração na terceira semana de gestação (C). Cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando: A) o teste t*wo-way* ANOVA sem medidas repetidas seguidas do pós-teste de *Bonferroni*; B e C) teste de *one-way* ANOVA seguido de pós-teste de *Tukey*. $^{a}p<0,01$ *versus* HO10

A ingestão hídrica materna foi avaliada semanalmente. Foi observado um aumento do consumo de água em todos os grupos da primeira para a segunda semana e da segunda para a terceira semana nos grupos HO, HO10 e HO20 ($p<0,05$). O volume de água ingerido durante as três semanas analisadas foi semelhante entre os grupos (Tabela 3).

Tabela 3: Consumo de água materna durante a gestação

Ingestão hídrica (mL. sem^{-1}.rato^{-1})	**NR**	**HO**	**HO10**	**HO20**
1ª semana	191±10 (8) [a]	191±8 (11) [a]	191±11 (10) [a]	198±9 (13) [a]
2ª semana	256±13 (8)	234±11 (11) [b]	248±9 (10) [b]	244±7 (15) [b]
3ª semana	286±16 (8)	318±17 (11)	312±22 (10)	289±7 (14)

Ingestão hídrica avaliada do primeiro dia de gestação até o nascimento da prole, representada semanalmente, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t*wo-way* ANOVA sem medidas repetidas seguidas do pós-teste de *Bonferroni*.[a]$p<0,05$= 1ª semana *versus* 2ª semana; [b]$p<0,05$= 2ª semana *versus* 3ª semana.

4.1.2 Evolução ponderal materna

A evolução ponderal materna foi avaliada através do ganho de peso e da velocidade de incremento através da área sob a curva. Assim, para análise do ganho de peso materno durante a primeira semana de gestação foi calculada a área sob a curva da evolução ponderal neste período. Não houve diferença entre os grupos experimentais (NR 17±0,9; HO 19±0,9; HO10 17±1,5; HO20 18±1,2).

O ganho de peso materno na terceira semana de gestação foi menor nos grupos HO (28±2,3) e HO20 (29±1,9) comparado aos grupos NR (46±2,1) e HO10 (47±3,5) (Figura 12).

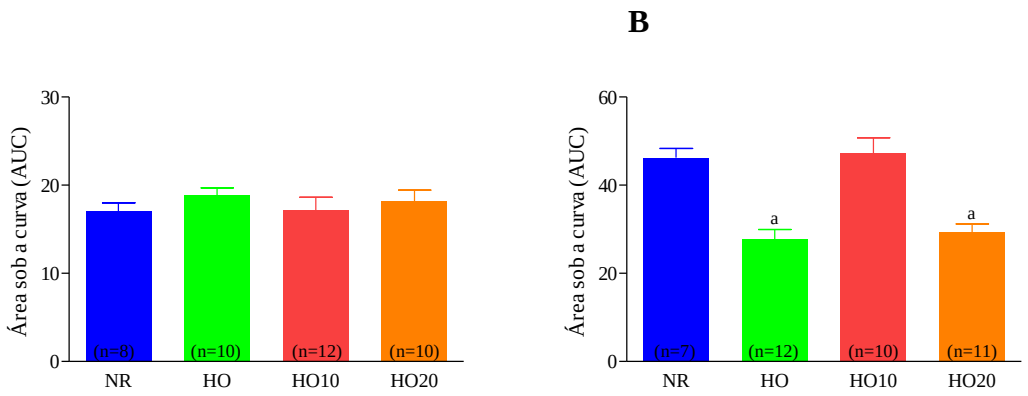


Figura 12: Ganho de peso materno durante a gestação. (A) Ganho de peso durante a primeira semana de gestação e (B) ganho de peso durante a terceira semana de gestação em ratas alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância *one-way* (ANOVA) e pós-teste de *Tukey*. [a]p<0,001 *versus* NR e HO10

4.1.3 Tamanho da prole

O tamanho da prole foi semelhante entre os grupos estudados. Também não houve diferença na proporção de machos e fêmeas entre os grupos (Tabela 4).

Tabela 4: Tamanho total da prole e número de machos e fêmeas

	NR	HO	HO10	HO20
Tamanho da prole (nº total de neonatos)	14±0,6 (10)	14±0,4 (14)	15±0,7 (14)	14±0,8 (13)
Nº de machos	6±0,5 (9)	8±0,5 (13)	7±0,9 (10)	6±0,8 (9)
Nº de fêmeas	7±0,5 (9)	6±0,5 (13)	7±0,8 (10)	6±1,0 (9)

Tamanho da prole (número total de neonatos) e número de machos e fêmeas em mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de mães analisadas. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*.

Para excluir a influência do tamanho da prole sobre o ganho de peso corpóreo da mãe realizamos o teste de correlação. Não houve correlação entre o tamanho da prole e o ganho de peso materno. Assim, é possível notar que o menor ganho de peso materno nos grupos HO e HO20 é independente do tamanho da prole (Figura 13).

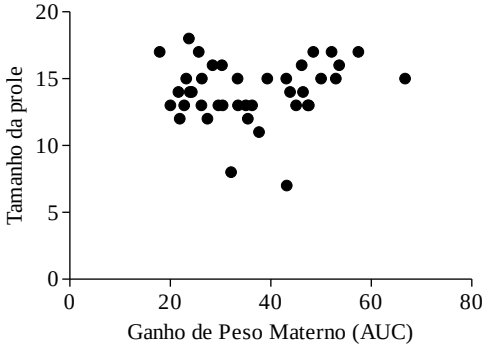


Figura 13: Correlação entre o ganho de peso materno durante a gestação e o tamanho da prole (número total de neonatos). Número de animais analisados n=40. A análise estatística foi realizada através do teste de correlação de *Pearson* (r=0,12; p=0,46).

4.1.4 Massa dos tecidos adiposos brancos

A massa dos tecidos adiposos brancos: gonadal, inguinal, mesentérico e retroperitoneal não apresentou diferença entre os grupos maternos (Tabela 5).

4.1.5 Índice de adiposidade

Nenhuma diferença foi observada entre os grupos maternos avaliados conforme observado na tabela 5.

4.1.6 Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal

A massa cardíaca, renal e suprarrenal não foi diferente entre os grupos. A massa hepática foi menor no grupo HO do que no grupo NR (Tabela 6).

Tabela 5: Massa do tecido adiposo branco gonadal, inguinal, mesentérico, retroperitoneal e índice de adiposidade [soma da massa dos tecidos adiposos brancos (g) x 100 x peso corpóreo^{-1}] de ratas gestantes alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Variáveis	NR	HO	HO10	HO20
Gonadal (g/100g peso corpóreo)	2,60±0,41 (5)	2,52±0,25 (8)	2,12±0,52 (8)	2,55±0,39 (10)
Inguinal (g/100g peso corpóreo)	4,14±1,19 (5)	3,5±0,25 (8)	3,15±0,29 (8)	3,1±0,38 (10)
Mesentérico (g/100g peso corpóreo)	1,02±0,11 (5)	1,07±0,16 (8)	1,19±0,22 (8)	1,04±0,13 (10)
Retroperitoneal (g/100g peso corpóreo)	0,88±0,17 (8)	1,12±0,17 (9)	0,99±0,15 (9)	1,01±0,19 (10)
Índice de adiposidade	8,92±1,77 (5)	8,28±0,73 (8)	7,47±0,87 (8)	7,69±1,00 (10)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*.

Tabela 6: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal em ratas gestantes alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Variáveis	NR	HO	HO10	HO20
Coração (g/100g peso corpóreo)	0,35±0,01 (8)	0,32±0,01 (9)	0,35±0,02 (10)	0,36±0,01 (10)
Rim (g/100g peso corpóreo)	0,35±0,01 (8)	0,32±0,01 (9)	0,34±0,01 (10)	0,35±0,01 (10)
Fígado (g/100g peso corpóreo)	4,4±0,17 (8)	3,7±0,13 (9) [a]	4,2±0,14 (10)	4,1±0,18 (10)
Suprarrenal (g/100g peso corpóreo)	0,029±0,002 (10)	0,033±0,002 (8)	0,029±0,0016 (10)	0,032±0,001 (10)

Os resultados obtidos estão expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais. A análise estatística foi realizada utilizando o teste de análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR.

4.2 Grupo Prole

4.2.1 Natimortalidade

O número de animais natimortos do grupo HO20 foi maior comparado aos grupos HO e HO10, mas não ao grupo NR (Tabela 7).

Tabela 7: Matriz de *Chi-quadrado* do número de natimortos

	Nº animais nascidos	Óbitos	Não-óbitos
NR	157	7 (4,46%)	150 (95,54%)
HO	207	5 (2,42%)	202 (97,58%)
HO10	193	5 (2,60%)	188 (97,40%)
HO20	190	16 (8,42%)	174 (91,58%) [a]

Matriz de *Chi-quadrado* do número de natimortos em mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). Os valores são expressos em números absolutos e porcentagem. A análise estatística foi realizada através do teste de *Chi-quadrado* [a]$p<0,05$ *versus* HO e HO10.

Eventos importantes no grupo HO20 foram observados, fatos estes não observados nos demais grupos. De dezessete mães deste grupo, três canibalizaram suas proles; uma prole apresentou diarreia constante durante as vinte semanas de vida; de uma prole com dezoito animais, quatro eram natimortos e nove nasceram com a cauda necrosada e um filhote de outra mãe não abriu o olho.

4.2.2 Peso corpóreo dos neonatos

O peso corpóreo dos neonatos machos e fêmeas dos grupos HO e HO20 foi menor comparado aos grupos NR e HO10. Nos neonatos machos não houve diferença entre os grupos HO e HO20. Nos neonatos fêmeas, o peso corpóreo do grupo HO20 foi menor do que o do grupo HO. Não houve diferença entre os grupos NR e HO10 (Tabela 8).

4.2.3 Comprimento naso-anal dos neonatos

O comprimento naso-anal dos neonatos machos dos grupos HO e HO10 foi menor do que no grupo NR. O comprimento naso-anal do grupo HO20 foi menor que o dos grupos NR e HO10. As fêmeas dos grupos HO e HO20 também foram menores comparados aos grupos NR e HO10. O comprimento naso-anal do grupo HO20 foi menor do que o do grupo HO. Não houve diferença entre os grupos NR e HO10 (Tabela 8).

4.2.4 Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal dos neonatos

A massa cardíaca, renal e hepática não foi diferente entre os grupos de neonatos machos e fêmeas. A massa suprarrenal nos neonatos machos foi menor no grupo HO comparado ao grupo NR. Nas fêmeas a massa suprarrenal tanto do grupo HO e HO10 foi menor do que o NR (Tabela 9).

Tabela 8: Peso corpóreo e comprimento naso-anal de neonatos machos e fêmeas em mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
Peso corpóreo (g)	6,6±0,05 (65)	5,4±0,07 (88) [a]	6,6±0,07 (77)	5,3±0,08 (60) [a]
Comprimento naso-anal (cm)	5,2±0,02 (48)	4,9±0,02 (66) [b]	5,0±0,04 (44) [b]	4,8±0,03 (40) [b, d]
Fêmeas				
Peso corpóreo (g)	6,1±0,06 (79)	5,3±0,09 (69) [a]	6,1±0,08 (78)	4,9±0,10 (54) [a, c]
Comprimento naso-anal (cm)	5,1±0,03 (57)	4,8±0,03 (64) [a]	5,0±0,04 (45)	4,5±0,04 (29) [a, c]

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,001$ *versus* NR e HO10; [b]$p<0,001$ *versus* NR; [c]$p<0,01$ *versus* HO; [d]$p<0,01$ *versus* HO10.

Tabela 9: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal das proles neonatal de machos e fêmeas em mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Variáveis - Neonatos	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
Coração				
(g/10g peso corpóreo)	0,07±0,002 (24)	0,07±0,002 (45)	0,07±0,002 (28)	0,07±0,003 (20)
Rim				
(g/10g peso corpóreo)	0,10±0,002 (24)	0,11±0,002 (45)	0,10±0,002 (28)	0,11±0,003 (20)
Fígado				
(g/10g peso corpóreo)	0,44±0,041 (11)	0,47±0,011 (19)	0,47±0,005 (13)	0,51±0,012 (12)
Suprarrenal				
(g/10g peso corpóreo)	0,0063±0,0004 (25)	0,0048±0,0003 (36) [a]	0,0055±0,0004 (20)	0,0053±0,0004 (18)
Fêmeas				
Coração				
(g/10g peso corpóreo)	0,10±0,021 (26)	0,07±0,001 (32)	0,07±0,002 (18)	0,07±0,003 (16)
Rim				
(g/10g peso corpóreo)	0,10±0,003 (26)	0,10±0,003 (32)	0,10±0,002 (18)	0,10±0,003 (16)
Fígado				
(g/10g peso corpóreo)	0,51±0,013 (17)	0,49±0,011 (14)	0,48±0,013 (8)	0,49±0,034 (9)
Suprarrenal				
(g/10g peso corpóreo)	0,0068±0,0003 (22)	0,0047±0,0002 (31) [a]	0,0054±0,0003 (18) [a]	0,0059±0,0007 (13)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR.

4.2.5 Evolução ponderal dos neonatos

Os machos do grupo HO a partir da primeira semana de vida conseguiram obter um crescimento semelhante (*catch-up growth*) ao grupo NR até a terceira semana de vida. O grupo HO20 na primeira semana de vida foi menor comparado aos demais grupos, na segunda semana continuou menor comparado ao grupo HO e na terceira semana tanto o grupo HO20 como o HO10 permaneceram menores do que o NR e HO. Nas fêmeas a evolução ponderal dos neonatos foi semelhante aos machos. O grupo HO20 na primeira semana de vida foi menor comparado ao grupo NR. O grupo HO10 na terceira semana de vida foi menor comparado ao grupo NR e HO e o grupo HO20 foi menor comparado aos demais grupos (Figura 14; Tabela 10).

A B

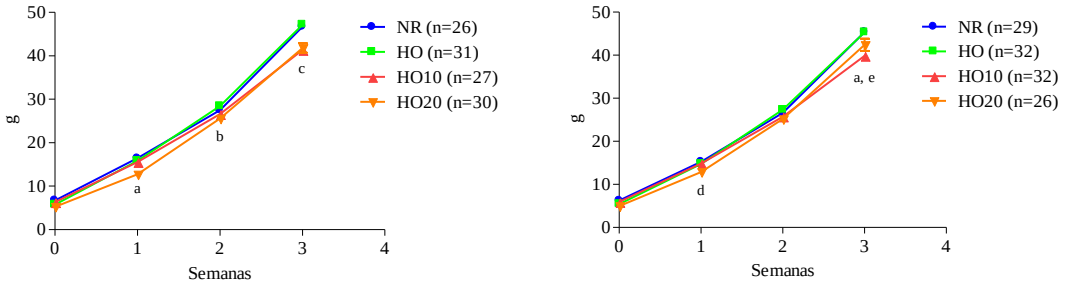


Figura 14: Evolução ponderal dos neonatos machos e fêmeas. (A) Evolução ponderal dos neonatos machos do nascimento a terceira semana de vida (B) Evolução ponderal dos neonatos fêmeas do nascimento a terceira semana de vida de mães que foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada utilizando análise de variância *two-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Bonferroni*. [a]$p<0,01$ HO20 *versus* NR, HO e HO10; [b]$p<0,01$ HO20 *versus* HO; [c]$p<0,001$ HO20 e HO10 *versus* NR e HO; [d]$p<0,01$ HO20 *versus* NR; [e]$p<0,01$ HO10 *versus* NR e HO.

Tabela 10: Evolução ponderal dos neonatos machos e fêmeas de mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20).

Peso Corpóreo (g)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
1ª semana	16,5±0,6 (26)	15,9±0,3 (31)	15,6±0,3 (27)	12,7±0,6 (30) [a]
2ª semana	27,5±0,4 (26)	28,4±0,6 (31)	26,6±0,5 (27)	25,6±0,7 (30) [b]
3ª semana	46,7±0,8 (26)	47,2±0,9 (31)	41,4±0,9 (27) [c]	41,8±1,1 (30) [c]
Fêmeas				
1ª semana	15,3±0,4 (29)	14,8±0,3 (32)	14,8±0,4 (32)	12,9±0,5 (26) [a]
2ª semana	26,6±0,4 (29)	27,4±0,4 (32)	25,7±0,7 (32)	25,2±0,9 (26)
3ª semana	45,38±0,6 (29)	45,3±0,8 (32)	39,8±1,0 (32) [c]	42,4±1,4 (26)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR, HO e HO10; [b]$p<0,05$ *versus* HO; [c]$p<0,05$ *versus* NR e HO.

4.2.6 Consumo de ração e ingestão hídrica da prole

O consumo de ração e ingestão hídrica foi avaliado desde o desmame (a partir da terceira semana de vida) até a vigésima semana de vida. O consumo foi divido em duas fases. A primeira que se refere ao período da terceira a décima segunda semana de vida (contabilizando um total de nove semanas de consumo) e a segunda fase referente à décima terceira até a vigésima semana de vida (um total de oito semanas de consumo).

Não houve diferença do consumo de ração nos machos e fêmeas durante o período avaliado (Tabela 11).

A ingestão hídrica avaliada da terceira a décima segunda semana de vida foi maior no grupo HO20 dos machos comparado aos grupos NR e HO10. O mesmo resultado foi observado nas proles de fêmeas, o grupo HO20 apresentou maior consumo de água comparado aos grupos NR, HO e HO10. Não houve diferença na ingestão hídrica tanto de machos quanto de fêmeas da décima terceira a vigésima semana de vida (Tabela 12).

Tabela 11: Consumo de ração dos machos e fêmeas da prole de mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Ração (g)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
3ª - 12ª semana	1.497±18 (26)	1.516±20 (31)	1.545±43 (28)	1.503±21 (32)
13ª - 20ª semana	1.960±99 (9)	1.932±35 (6)	1.985±100 (6)	1.813±28 (7)
Fêmeas				
3ª - 12ª semana	1.134±16 (28)	1.104±11 (32)	1.105±7 (30)	1.174±29 (18)
13ª - 20ª semana	1.221±20 (11)	1.330±58 (6)	1.340±64 (7)	1.332±86 (3)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*.

Tabela 12: Ingestão hídrica da prole de machos e fêmeas de mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Ingestão hídrica (mL)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
3ª - 12ª semana	1.821±40 (26)	1.966±47 (31)	1.942±34 (28)	2.116±54 (32) [a]
13ª - 20ª semana	2.552±113 (9)	2.842±117 (6)	2.791±224 (6)	2.747±153 (7)
Fêmeas				
3ª - 12ª semana	1.361±25 (28)	1.424±22 (31)	1.458±24 (30)	1.630±46 (18) [b]
13ª - 20ª semana	1.846±53 (11)	1.850±112 (6)	1.754±64 (7)	1.920±14 (3)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR, HO10; [b]$p<0,05$ *versus* NR, HO, HO10.

4.2.7 Evolução ponderal da prole

O peso corpóreo avaliado na décima e na vigésima semana de vida não mostrou diferença estatística entre os grupos tanto nas proles de machos quanto nas fêmeas.

Tabela 13: Peso corpóreo das proles de machos e fêmeas de mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Peso Corpóreo (g)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
12ª semana	393±7 (25)	406±7 (34)	385±5 (31)	402±5 (39)
20ª semana	494±12 (9)	521±11 (12)	475±9 (10)	500±13 (14)
Fêmeas				
12ª semana	253±4 (28)	248±3 (40)	259±4 (37)	254±4 (26)
20ª semana	317±16 (11)	298±5 (12)	308±10 (14)	296±9 (11)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*.

4.2.8 Massa dos tecidos adiposos brancos

A massa do tecido adiposo branco gonadal dos machos avaliado na décima segunda semana de vida do grupo HO foi maior comparado aos grupos NR, HO10 e HO20. A massa do tecido adiposo branco retroperitoneal do grupo HO também foi maior que os grupos NR e HO10. Não houve diferença entre os grupos experimentais na massa dos demais tecidos adiposos brancos analisados (Tabela 14).

A massa do tecido adiposo branco gonadal nas fêmeas da prole com doze semanas do grupo HO foi maior comparado ao grupo HO10 (Tabela 14).

A massa do tecido adiposo branco mesentérico com vinte semanas de vida tanto dos machos quanto das fêmeas do grupo HO20 foi maior comparado ao grupo NR e HO10 e NR e HO, respectivamente. Não houve diferença na massa dos demais tecidos analisados com vinte semanas de vida (Tabela 15).

4.2.9 Índice de adiposidade

A avaliação da obesidade realizada através do índice de adiposidade na décima segunda semana de vida nos machos mostrou que o índice de adiposidade do grupo HO é maior comparado aos demais grupos (Tabela 14). Essa obesidade não foi evidenciada nos grupos com vinte semanas de vida (Tabela 15).

Não houve diferença no índice de adiposidade na prole de fêmeas (Tabelas 14 e 15).

4.2.10 Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal nos machos e fêmeas das proles

Nas análises realizadas nos machos com doze semanas a massa cardíaca do grupo HO foi menor comparada aos grupos HO10 e HO20, já a massa cardíaca do grupo HO10 foi maior comparada ao grupo NR. A massa renal do grupo HO foi menor que do grupo HO10. Nenhuma diferença foi encontrada na massa hepática. A massa da suprarrenal do grupo HO foi menor comparada aos grupos NR e HO20 (Tabela 16).

Nos machos com vinte semanas de vida não houve diferença entre os grupos experimentais nas massas dos órgãos analisados (Tabelas 17).

As fêmeas com doze semanas apresentaram massas cardíacas e renais semelhantes entre os grupos. Também não houve diferença na massa das suprarrenais entre os grupos. A massa hepática do grupo HO foi menor comparada ao grupo HO10 (Tabela 16).

Não foi detectada nenhuma diferença das massas analisadas nas fêmeas com vinte semanas de vida (Tabela 17).

Tabela 14: Massa do tecido adiposo branco gonadal, inguinal, mesentérico, retroperitoneal e índice de adiposidade [soma da massa dos tecidos adiposos brancos (g) x 100 x peso corpóreo^{-1}] dos machos e fêmeas das proles com 12 semanas de vida cujas mães foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Tecido adiposo branco – 12 semanas de vida	**NR**	**HO**	**HO10**	**HO20**
Machos				
Gonadal (g/100g peso corpóreo)	1,13±0,06 (6)	1,64±0,11 (7) [a]	1,08±0,08 (7)	1,06±0,08 (9)
Inguinal (g/100g peso corpóreo)	1,40±0,18 (6)	1,94±0,15 (7)	1,45±0,10 (7)	1,42±0,17 (9)
Mesentérico (g/100g peso corpóreo)	0,79±0,12 (6)	0,86±0,05 (7)	0,71±0,10 (7)	0,74±0,06 (9)
Retroperitoneal (g/100g peso corpóreo)	0,86±0,06 (13)	1,37±0,11 (23) [b]	0,96±0,08 (18)	1,12±0,11 (21)
Índice de adiposidade	4,04±0,36 (6)	6,01±0,48 (7) [a]	4,15±0,34 (7)	4,10±0,47 (9)
Fêmeas				
Gonadal (g/100g peso corpóreo)	2,09±0,14 (6)	2,52±0,28 (7) [c]	1,72±0,12 (9)	2,40±0,34 (4)
Inguinal (g/100g peso corpóreo)	1,16±0,12 (6)	1,42±0,19 (7)	1,21±0,07 (9)	1,18±0,12 (4)
Mesentérico (g/100g peso corpóreo)	0,81±0,15 (6)	0,90±0,10 (7)	0,92±0,07 (9)	0,83±0,082 (4)
Retroperitoneal (g/100g peso corpóreo)	0,70±0,06 (16)	0,82±0,08 (24)	0,93±0,07 (18)	0,95±0,10 (12)
Índice de adiposidade	5,1±0,46 (6)	5,9±0,75 (7)	4,6±0,28 (9)	5,3±0,67 (4)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR, HO10 e HO20; [b]$p<0,05$ *versus* NR, HO10; [c]$p<0,05$ *versus* HO10.

Tabela 15: Massa do tecido adiposo branco gonadal, inguinal, mesentérico, retroperitoneal e índice de adiposidade [soma da massa dos tecidos adiposos brancos (g) x 100 x peso corpóreo^{-1}] nos machos e fêmeas das proles com 20 semanas de vida cujas mães foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Tecido adiposo branco – 20 semanas de vida	**NR**	**HO**	**HO10**	**HO20**
Machos				
Gonadal (g/100g peso corpóreo)	1,27±0,12 (8)	1,42±0,11 (10)	1,28±0,06 (9)	1,53±0,15 (13)
Inguinal (g/100g peso corpóreo)	1,49±0,20 (8)	1,83±0,20 (10)	1,31±0,16 (9)	1,39±0,10 (14)
Mesentérico (g/100g peso corpóreo)	0,67±0,05 (8)	0,88±0,05 (10)	0,76±0,06 (9)	1,11±0,12 (14) [a]
Retroperitoneal (g/100g peso corpóreo)	0,98±0,17 (8)	1,42±0,26 (10)	0,78±0,06 (9)	1,14±0,11 (14)
Índice de adiposidade	4,32±0,49 (8)	5,52±0,59 (10)	4,14±0,21 (9)	5,29±0,32 (14)
Fêmeas				
Gonadal (g/100g peso corpóreo)	3,15±0,31 (10)	2,79±0,34 (12)	1,94±0,12 (12)	2,20±0,17 (10)
Inguinal (g/100g peso corpóreo)	1,84±0,18 (10)	1,52±0,12 (12)	1,35±0,07 (12)	1,47±0,11 (10)
Mesentérico (g/100g peso corpóreo)	1,14±0,07 (10)	1,05±0,05 (12)	1,65±0,26 (12)	2,15±0,28 (10) [b]
Retroperitoneal (g/100g peso corpóreo)	1,19±0,15 (10)	1,03±0,11 (12)	1,05±0,07 (12)	1,12±0,12 (10)
Índice de adiposidade	7,23±0,68 (10)	6,49±0,63 (12)	5,87±0,34 (12)	7,36±0,49 (10)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR e HO10; [b]$p<0,05$ *versus* NR e HO.

Tabela 16: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal nos machos e fêmeas das proles com 12 semanas de vida em mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Variáveis – 12 semanas de vida	**NR**	**HO**	**HO10**	**HO20**
Machos				
Coração				
(g/100g peso corpóreo)	0,31±0,004 (14)	0,30±0,003 (21) [a]	0,33±0,005 (19) [b]	0,32±0,004 (22)
Rim				
(g/100g peso corpóreo)	0,33±0,003 (14)	0,33±0,005 (23) [c]	0,35±0,006 (19)	0,33±0,005 (22)
Fígado				
(g/100g peso corpóreo)	3,8±0,10 (14)	3,7±0,11 (21)	3,8±0,13 (19)	3,9±0,08 (22)
Suprarrenal				
(g/100g peso corpóreo)	0,017±0,0007 (14)	0,015±0,0003 (22) [d]	0,016±0,0005 (18)	0,017±0,0006 (22)
Fêmeas				
Coração				
(g/100g peso corpóreo)	0,34±0,005 (16)	0,34±0,008 (25)	0,34±0,006 (19)	0,35±0,008 (12)
Rim				
(g/100g peso corpóreo)	0,32±0,005 (16)	0,32±0,003 (25)	0,32±0,006 (19)	0,33±0,009 (12)
Fígado				
(g/100g peso corpóreo)	3,6±0,11 (16)	3,4±0,07 (25) [c]	3,8±0,13 (19)	3,7±0,17 (12)
Suprarrenal				
(g/100g peso corpóreo)	0,028±0,002 (15)	0,029±0,001 (25)	0,030±0,001 (19)	0,031±0,001 (12)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* HO10 e HO20; [b]$p<0,05$ *versus* NR; [c]$p<0,05$ *versus* HO10; [d]$p<0,05$ *versus* NR e HO20.

Tabela 17: Massa cardíaca, renal, hepática e suprarrenal nos machos e fêmeas nas proles com 20 semanas de vida em mães alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Variáveis – 20 semanas de vida	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
Coração				
(g/100g peso corpóreo)	0,31±0,007 (9)	0,31±0,007 (12)	0,32±0,007 (9)	0,31±0,007 (14)
Rim				
(g/100g peso corpóreo)	0,32±0,006 (9)	0,34±0,009 (12)	0,35±0,009 (9)	0,33±0,007 (14)
Fígado				
(g/100g peso corpóreo)	3,30±0,10 (9)	3,57±0,14 (12)	3,68±0,15 (9)	3,61±0,11 (14)
Suprarrenal				
(g/100g peso corpóreo)	0,013±0,0004 (9)	0,014±0,0009 (10)	0,014±0,0008 (9)	0,015±0,0005 (14)
Fêmeas				
Coração				
(g/100g peso corpóreo)	0,32± 0,007 (11)	0,34±0,009 (14)	0,36±0,017 (14)	0,34±0,004 (11)
Rim				
(g/100g peso corpóreo)	0,30±0,005 (11)	0,33±0,011 (14)	0,32±0,007 (14)	0,32±0,004 (11)
Fígado				
(g/100g peso corpóreo)	3,13±0,116 (10)	3,24±0,14 (13)	3,09±0,08 (14)	3,29±0,10 (11)
Suprarrenal				
(g/100g peso corpóreo)	0,026±0,0010 (10)	0,047±0,0196 (14)	0,027±0,0017 (14)	0,030±0,001 (11)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*.

4.2.11 Glicemia

A glicemia medida nos neonatos machos no grupo HO20 foi maior que o grupo HO e HO10. A glicemia nos machos com doze semanas do grupo HO foi maior comparado aos demais grupos analisados. Com vinte semanas de vida a glicemia dos machos do grupo HO10 foi maior comparada aos grupos NR e HO20.

As glicemias avaliadas nas fêmeas tanto neonatais, como com doze e vinte semanas não apresentaram diferença estatística entre os grupos (Tabela 18).

4.2.12 Insulinemia

Não houve diferença na concentração de insulina medida na prole de machos neonatais e com doze semanas. Nos animais com vinte semanas o grupo HO10 apresentou uma insulinemia maior comparada ao grupo NR.

A insulinemia na prole de fêmeas neonatais e com 20 semanas de vida não foi diferente entre os grupos. Nas fêmeas com doze semanas de vida a insulinemia do grupo HO10 foi maior comparado ao grupo HO (Tabela 19).

4.2.13 Peptídeo-C sérico

O peptídeo-C nos machos neonatais e com vinte semanas de vida não foi diferente entre os grupos. A concentração de peptídeo-C sérico foi maior em machos com doze semanas de vida do grupo HO comparado aos demais grupos.

Similarmente aos machos, as fêmeas neonatais e com vinte semanas de vida também não apresentaram diferença estatística entre os grupos. Nas fêmeas com doze semanas do grupo HO a concentração de peptídeo-C foi maior do que nos grupos NR e HO20 (Tabela 20).

4.2.14 Leptina sérica

A concentração de leptina foi menor nos neonatos machos dos grupos HO, HO10 e HO20 comparada com o grupo NR. Nos machos com doze semanas a leptinemia do grupo HO20 foi maior do que nos grupos NR e HO10. Não houve diferença entre grupos nos machos com vinte semanas entre os grupos.

Não houve diferença na concentração sérica nas fêmeas neonatais, com doze e com vinte semanas de vida entre os grupos (Tabela 21).

4.2.15 IGF-1 sérico

Não houve diferença na concentração sérica de IGF-1 em machos neonatos entre os grupos. Nos machos com doze semanas a concentração de IGF-1 foi maior no grupo HO comparado com os grupos NR e HO20. Nos animais com 20 semanas de vida também não houve diferença entre os grupos.

Tanto nas fêmeas neonatais quanto nos animais com doze semanas não houve diferença entre os grupos. A concentração sérica de IGF-1 dos grupos HO e HO10 das fêmeas com vinte semanas de vida foi maior comparado ao grupo HO20 (Tabela 22).

Tabela 18: Glicemia dos machos e fêmeas das proles neonatais, com 12 e 20 semanas de vida cujas mães foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Glicemia (mg/dL)	**NR**	**HO**	**HO10**	**HO20**
Machos				
Neonatos	97±4 (42)	88±5 (53)	87±3 (51)	116±8 (32) [a]
12ª semana	103±1 (20)	110±3 (28) [b]	100±2 (23)	97±2 (32)
20ª semana	120±2 (8)	133±4 (10)	137±3 (9) [c]	121±4 (14)
Fêmeas				
Neonatos	95±2 (42)	97±3 (36)	89±3 (38)	97±5 (23)
12ª semana	122±2 (22)	123±2 (28)	125±2 (26)	119±2 (16)
20ª semana	123±3 (11)	126±4 (14)	123±2 (14)	114±3 (11)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* HO e HO10; [b]$p<0,05$ *versus* NR, HO10 e HO20; [c] $p<0,05$ *versus* NR e HO20.

Tabela 19: Insulina sérica dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida cujas mães foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Insulinemia (pM)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
Neonatos	179±73 (4)	88±5 (4)	116±29 (5)	95±12 (3)
12ª semana	407±39 (9)	434±17 (10)	443±51 (9)	411±39 (10)
20ª semana	231±30 (8)	245±51 (6)	395±43 (6) [a]	259±40 (7)
Fêmeas				
Neonatos	407±190 (6)	132±38 (3)	71±14 (6)	71±7 (3)
12ª semana	259±37 (8)	154±15 (9)	347±58 (8) [b]	214±29 (9)
20ª semana	140±10 (8)	131±20 (6)	148±20 (6)	161±23 (4)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR; [b]$p<0,05$ *versus* HO.

Tabela 20: Peptídeo-C sérico dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida cujas mães foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Peptídeo-C (pM)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
Neonatos	985±90 (4)	769±262 (3)	798±151 (5)	618±239 (3)
12ª semana	408±31 (4)	1117±153 (5) [a]	528±112 (4)	284±116 (8)
20ª semana	807±157 (9)	952±368 (5)	801±166 (6)	991±159 (7)
Fêmeas				
Neonatos	1372±119 (3)	1025±158 (3)	989±233 (4)	736±185 (3)
12ª semana	233±64 (4)	509±27 (5) [b]	378±45 (6)	157±54 (8)
20ª semana	557±71 (11)	375±77 (6)	347±57 (7)	475±55 (4)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR, HO10 e HO20; [b] $p<0,05$ *versus* NR e HO20.

Tabela 21: Leptina sérica dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida cujas mães foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

Leptina (ng/mL)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
Neonatos	4,0±0,3 (2)	1,1±0,2 (2) [a]	1,6±0,5 (3) [a]	0,3±0,1 (2) [a]
12ª semana	3,2±0,3 (10)	5,0±1,2 (10)	2,8±0,2 (10)	5,7±1,0 (10) [b]
20ª semana	6,0±1,0 (9)	5,0±0,9 (6)	5,7±0,7 (6)	4,6±0,6 (7)
Fêmeas				
Neonatos	2,0±0,7 (4)	0,9±0,1 (2)	0,6±0,1 (3)	0,02±0,0004 (2)
12ª semana	3,8±0,5 (10)	2,6±0,5 (10)	3,4±0,7 (5)	2,6±0,5 (10)
20ª semana	5,8±0,8 (11)	5,6±1,2 (6)	4,0±0,50 (7)	4,0±1,1 (3)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR; [b]$p<0,05$ *versus* NR e HO10.

Tabela 22: IGF-1 sérico dos machos e fêmeas das proles neonatais e com 12 e 20 semanas de vida cujas mães foram alimentadas com dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20)

IGF-1 (ng/mL)	NR	HO	HO10	HO20
Machos				
Neonatos	6,14±2,04 (4)	4,29±0,74 (6)	4,48±0,62 (6)	3,35±1,44 (4)
12ª semana	1.235±130 (5)	2.353±377 (5) [a]	1.530±193 (5)	1.253±149 (5)
20ª semana	1.267±145 (7)	1.640±178 (6)	1.530±213 (8)	1.230±146 (9)
Fêmeas				
Neonatos	5,37±1,13 (6)	3,38±0,60 (5)	6,04±1,02 (6)	1,91±0,98 (6)
12ª semana	784±87 (5)	972±125 (5)	885±105 (5)	1.009±105 (5)
20ª semana	710±67 (8)	869±104 (8) [b]	899±61 (8) [b]	525±65 (8)

Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*. [a]$p<0,05$ *versus* NR e HO20; [b]$p<0,05$ *versus* HO20.

4.2.16 GTT

Os valores de glicemia foram mais altos no grupo HO em comparação aos grupos HO10 e HO20 no tempo 5 minutos e maior que o grupo NR no tempo 15 minutos nos machos da prole com 12 semanas. A área sob a curva do grupo HO foi maior comparada aos grupos NR e HO20 (Figura 15).

Nos machos com vinte semanas o grupo HO apresentou valores de glicemia estatisticamente superiores aos grupos NR e HO10 no tempo 5 minutos, e superior ao grupo HO20 nos tempos de 30 e 60 minutos. No grupo HO10 a glicemia foi maior que o grupo HO20 nos tempos 30 e 60 minutos. Na análise da área sob a curva o grupo HO apresentou área maior que o grupo NR (Figura 15).

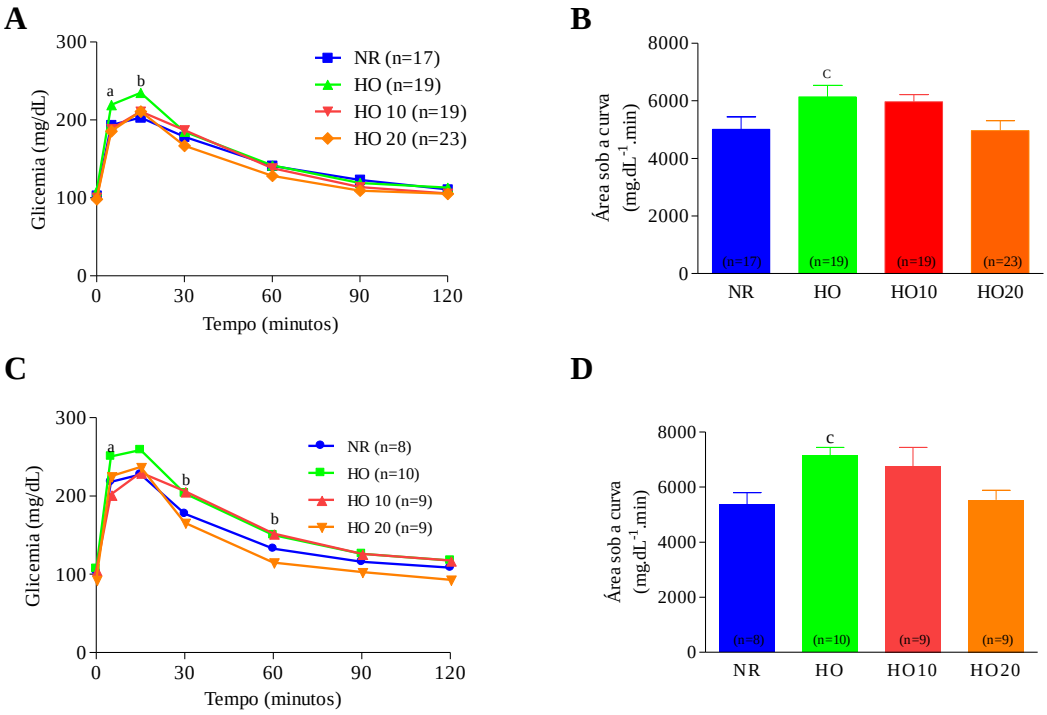


Figura 15: Teste de tolerância à glicose (GTT) nos machos das proles com 12 e 20 semanas de vida, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) GTT nos machos com 12 semanas de idade. [a]p<0,05 HO *versus* HO10 e HO20 (5 minutos); [b] p<0,05 HO *versus* NR (15 minutos). (B) Área sob a curva dos machos com 12 semanas de idade [c]p<0.05 HO *versus* NR e HO20; (C) GTT dos machos com 20 semanas de idade. [a]p<0,05 HO *versus* NR e HO10 (5 minutos); [b]p<0,01 HO e HO10 *versus* HO20 (30 e 60 minutos); (D) Área sob a curva dos machos com 20 semanas de idade; [c]p<0,01 HO *versus* NR. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Bonferroni* (A, C) e análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida de pós-teste de *Tukey* (B, D)

Nas fêmeas das proles com 12 semanas o grupo HO apresentou valores de glicemia superiores ao grupo NR nos tempos 15 e 30 minutos. Entretanto, não houve diferença estatística quando foi analisada a área sob a curva (Figura 16).

No GTT analisado nas fêmeas com vinte semanas não houve diferença entre os grupos (Figura 16).

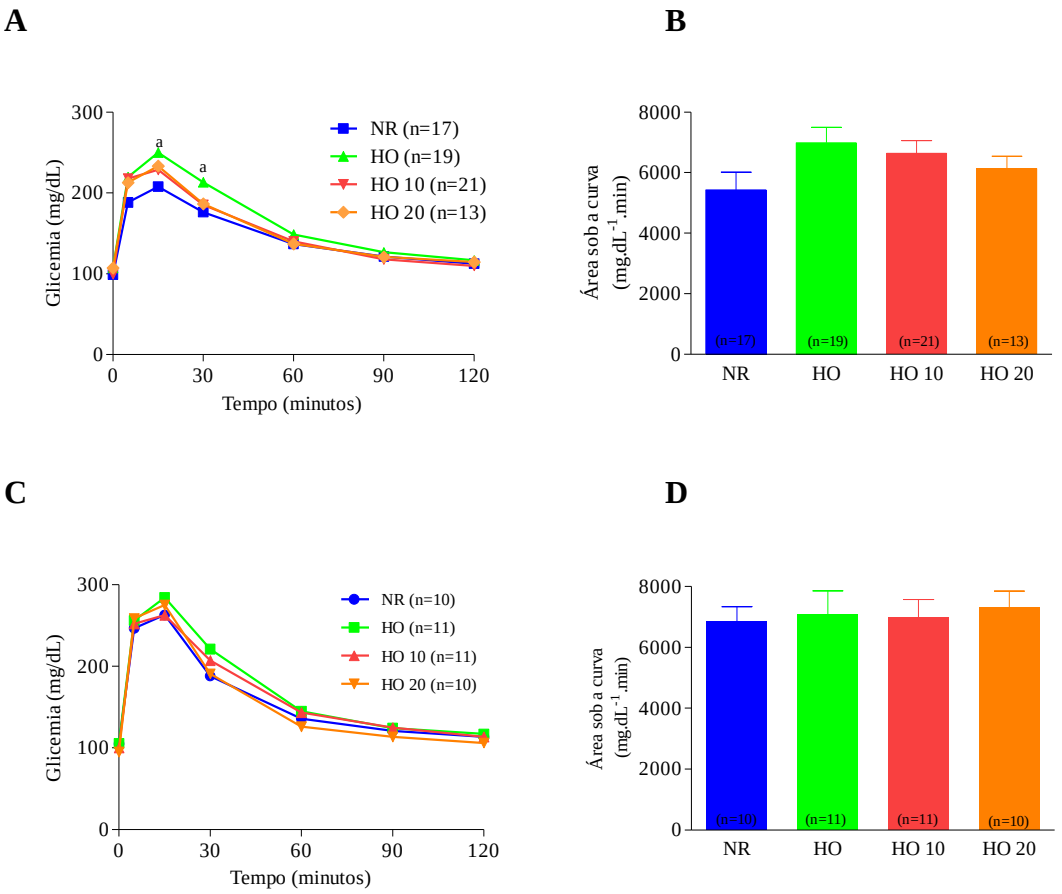


Figura16: Teste de tolerância à glicose (GTT) nas fêmeas das proles com 12 e 20 semanas de vida, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) GTT das fêmeas com 12 semanas de idade. $^{a}p<0,05$ HO *versus* NR (15 e 30 minutos). (B) Área sob a curva das fêmeas com 12 semanas de idade; (C) GTT das fêmeas com 20 semanas de idade. (D) Área sob a curva das fêmeas com 20 semanas de idade. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Bonferroni* (A, C) e análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida de pós-teste de *Tukey* (B, D)

4.2.17 ITT

No ITT realizado nos machos com dozes semanas de idade a taxa de decaimento da glicose (inclinação da reta) não diferiu entre os grupos.

Em machos com 20 semanas verificou-se que a glicemia foi maior no tempo 15 minutos nos grupos HO e HO10 em comparação ao grupo HO20, porém, a inclinação da reta não diferiu entre os grupos (Figura 17).

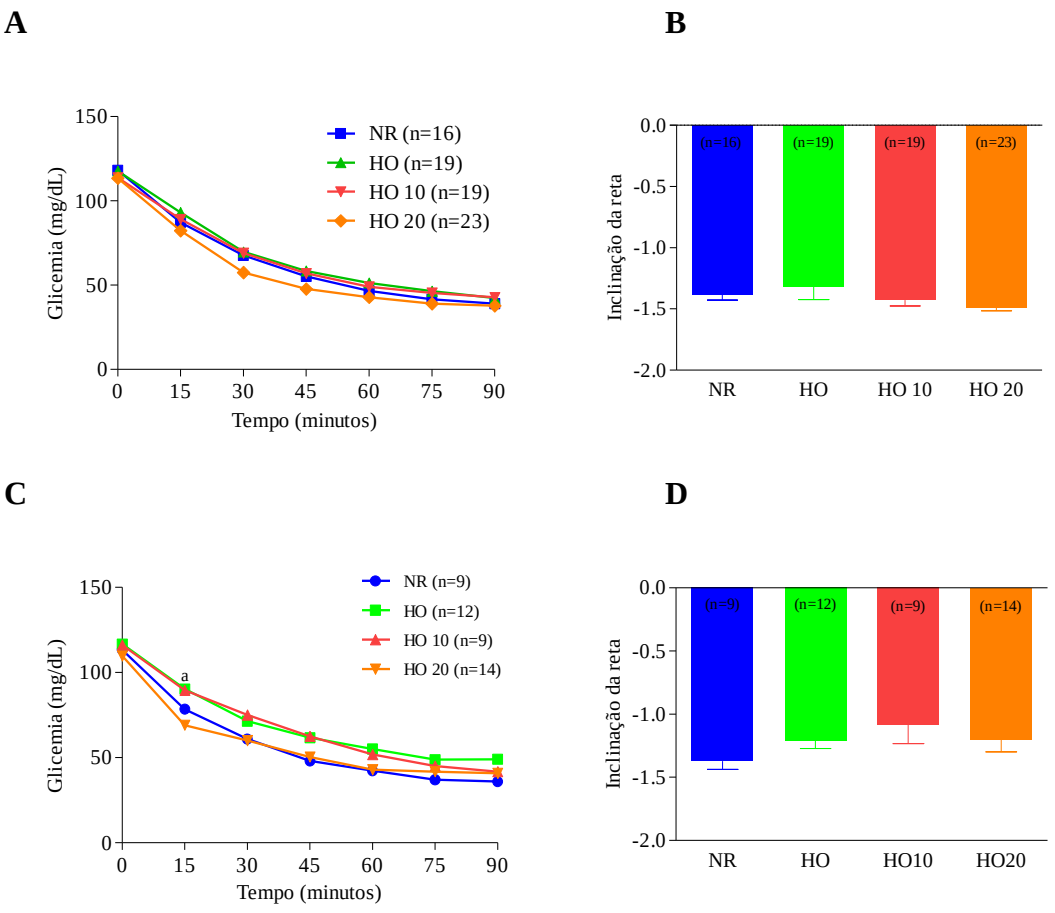


Figura 17: Teste de tolerância à insulina (ITT) nos machos das proles com 12 e 20 semanas de vida, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) ITT dos machos com 12 semanas de idade. (B) Inclinação da reta (decaimento da taxa de glicose) dos machos com 12 semanas de idade. (C) ITT dos machos com 20 semanas de idade. $^{a}p<0,05$ HO e HO10 *versus* HO20 (15 minutos). (D) Inclinação da reta dos machos das proles com 20 semanas de idade. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Bonferroni* (A, C) e análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida de pós-teste de *Tukey* (B, D)

Não houve diferença no ITT realizado nas fêmeas com doze semanas. Embora não tenha havido diferença significante entre os valores de glicemia nas proles de fêmeas com vinte semanas, a taxa de decaimento da glicemia do grupo HO (inclinação da reta) foi menor em relação ao grupo NR (Figura 18).

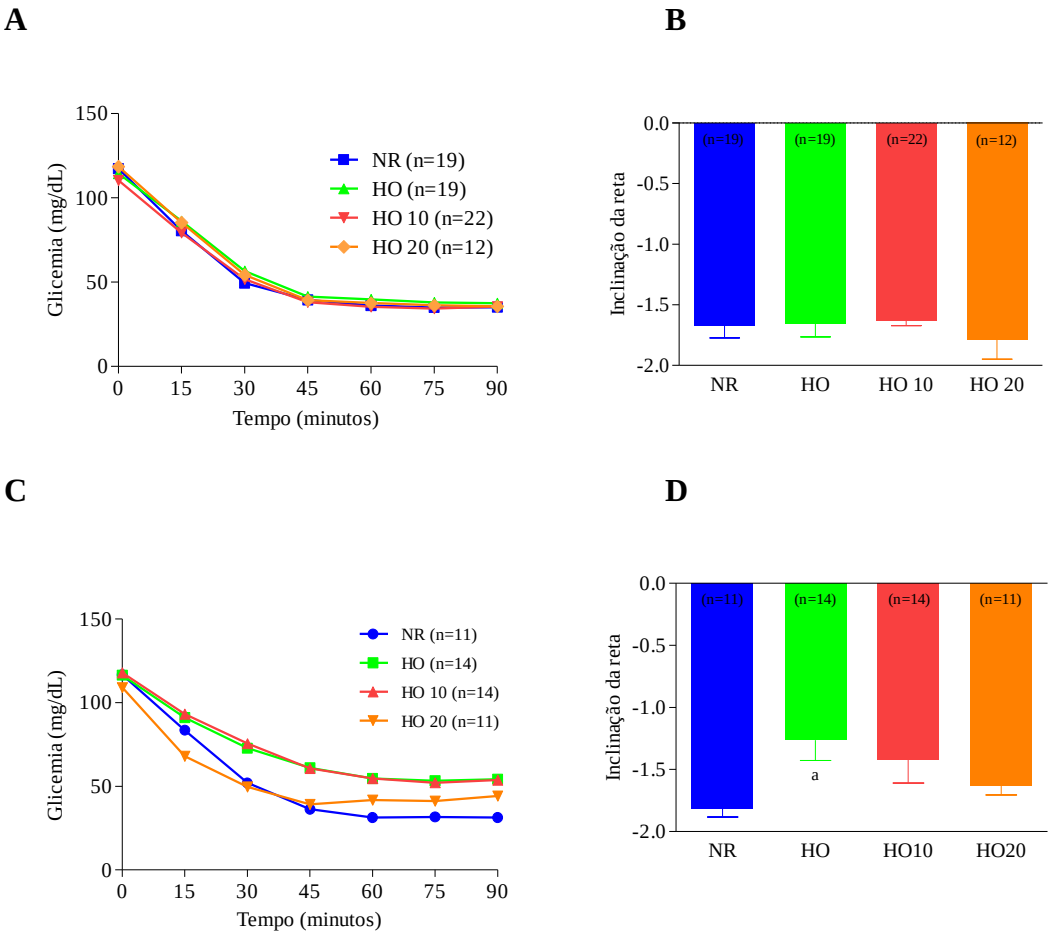


Figura 18: Teste de tolerância à insulina (ITT) nas fêmeas das proles com 12 e 20 semanas de vida, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) ITT das fêmeas com 12 semanas de idade. (B) Inclinação da reta (decaimento da taxa de glicose) das fêmeas com 12 semanas de idade. (C) ITT das fêmeas com 20 semanas de idade. (D) Inclinação da reta das fêmeas das proles com 20 semanas de idade $^{a}p<0,05$ HO *versus* NR. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *two-way* seguido de pós-teste de *Bonferroni* (A, C) e análise de variância *one-way* (ANOVA) seguida de pós-teste de *Tukey* (B, D)

4.2.18 HOMA-IR

A sensibilidade à insulina foi avaliada pelo índice HOMA-IR. Quanto maior este índice menor é a sensibilidade à insulina. O índice HOMA-IR dos machos das proles com doze semanas de idade do grupo HO foi maior comparado ao grupo NR. Nos machos com vinte semanas o índice HOMA-IR foi maior no grupo HO10 comparado aos grupos NR e HO20 (Figura 19).

O índice HOMA-IR das fêmeas das proles com doze semanas de idade do grupo HO10 foi maior comparado ao grupo HO. O índice HOMA-IR das fêmeas com vinte semanas não diferiu entre os grupos (Figura 19).

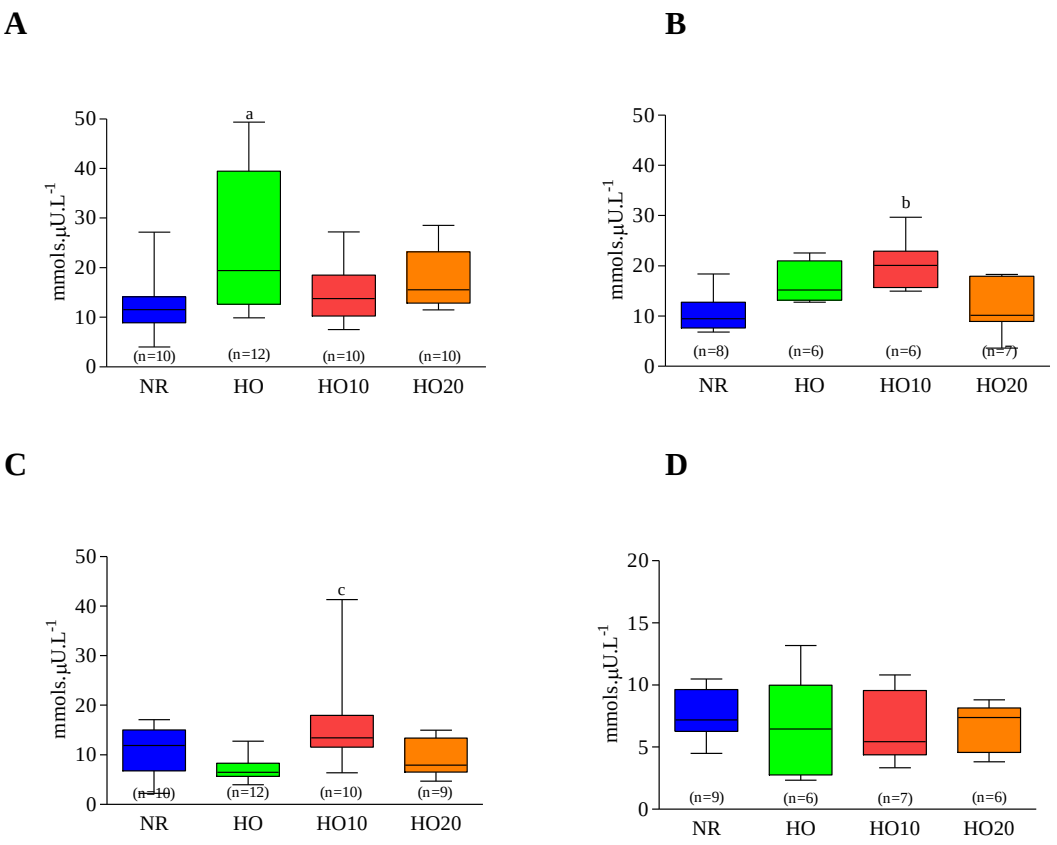


Figura 19: Índice HOMA-IR nos machos e fêmeas das proles com 12 e 20 semanas de vida, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Índice HOMA-IR dos machos com 12 semanas de idade $^{a}p<0,05$ *versus* NR. (B) Índice HOMA-IR dos machos com 20 semanas e idade $^{b}p<0,05$ *versus* NR e HO20. (C) Índice HOMA-IR das fêmeas com 12 semanas de idade $^{c}p<0,05$ *versus* HO. (D) Índice HOMA-IR das fêmeas com 20 semanas de idade. Os valores são expressos como mediana (25º percentil; 75º percentil). Os valores entre parênteses indicam o número de animais analisados. A análise estatística foi realizada através do teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste *Dunn*

4.2.19 Expressão gênica

As amostras de fígado de neonatos e de fígado, músculo e tecido adiposo branco retroperitoneal de machos e fêmeas de proles com 20 semanas de idade foram extraídos para obtenção do RNA total e assim realização dos ensaios de RT-PCR quantitativos, utilizando-se iniciadores específicos para cada gene de interesse (Tabela 1).

Os resultados de qRT-PCR representam valores médios obtidos em duplicata, correspondentes a pelo menos cinco experimentos independentes realizados.

Os dados de expressão gênica relativa foram calculados utilizando-se o *pool* total de cada tecido das proles de machos e fêmeas do grupo NR como referência para a expressão dos marcadores específicos.

A correção pelo fator de normalização foi calculada pelo programa computacional Rotor-gene Q Series Software 2.1.0, a partir dos níveis de expressão gênica de 18S, sendo utilizado como controle endógeno. O gene 18S foi escolhido como melhor controle endógeno por ser mais estável.

A expressão do gene *Ins1* não foi detectável no fígado de neonatos machos. Os níveis de expressão gênica no fígado de neonatos machos dos genes *Ins2* e *Insr* não diferiram entre os grupos. Os níveis de expressão gênica do *Igf1* encontram-se diminuídos em todos os grupos cujas mães consumiram dieta hipossódica durante a gestação comparada ao grupo NR em fígado de neonatos machos ($p<0,05$) (Figura 20).

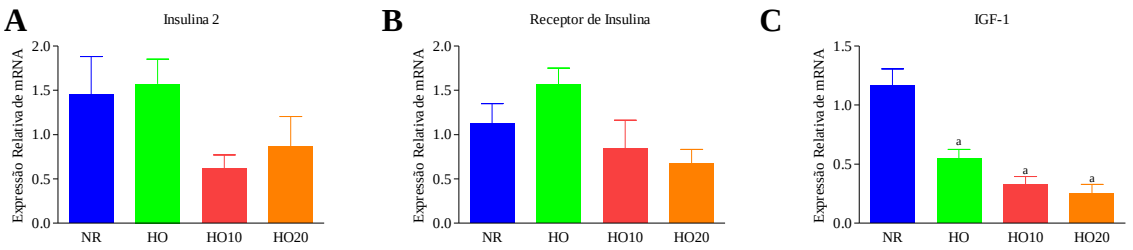


Figura 20: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de neonatos machos cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Ins2*; (B) *Insr*; (C) *Igf1* $^{a}p<0,001$ *versus* NR. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Os genes *Ins1* e *Ins2* não expressaram no fígado de neonatos fêmeas. Os níveis de expressão gênica no fígado de neonatos fêmeas dos genes *Insr* e *Igf1* não diferiram entre os grupos.

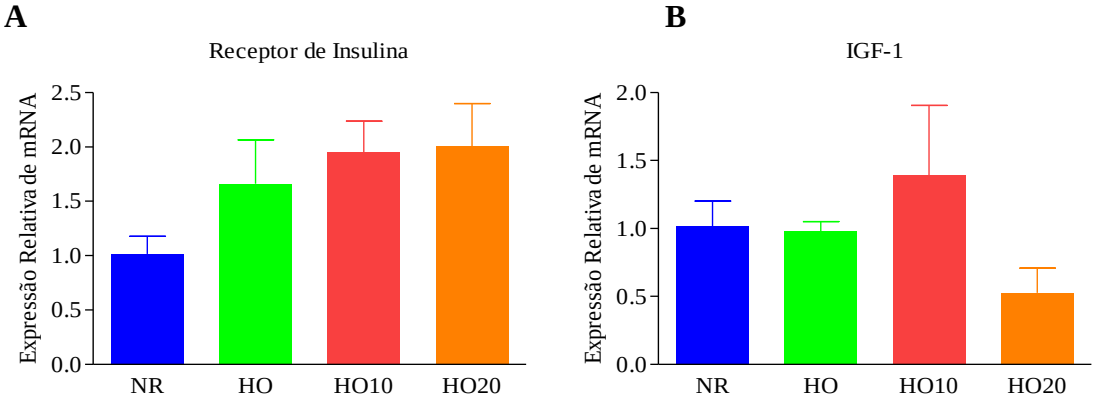


Figura 21: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de neonatos fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Insr*; (B) *Igf1*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A expressão dos genes *Ins1* e *Ins2* não foram detectáveis no fígado de machos das proles com 20 semanas de idade. Os níveis de expressão gênica do *Insr* e de *Igf1*, avaliados no fígado de machos das proles com 20 semanas de idade não apresentaram diferença estatística.

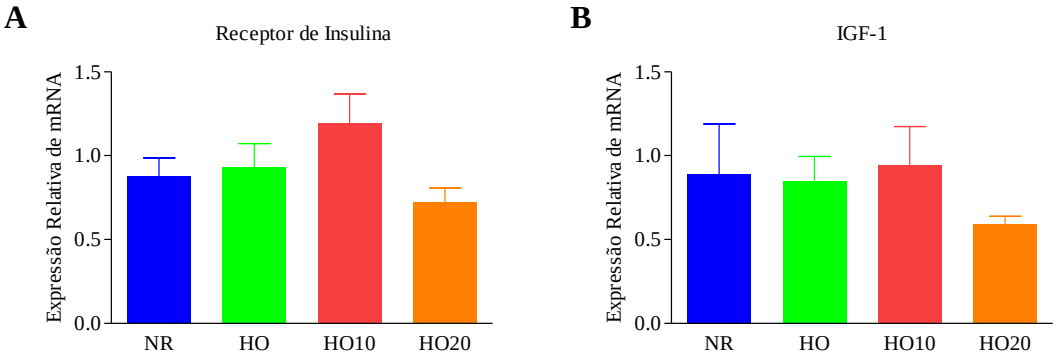


Figura 22: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de machos de proles com 20 semanas de idade cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Insr*; (B) *Igf1*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Os níveis de expressão dos genes *Ins1* e *Ins2* não diferiram entre os grupos no músculo de machos das proles com 20 semanas de idade. A expressão gênica do *Insr*, avaliada no músculo de machos das proles com 20 semanas de idade mostrou-se aumentada no grupo HO20 em relação aos demais grupos analisados. O nível de expressão do gene de *Igf1* no HO20 também foi maior comparado aos grupos NR e HO no músculo de machos das proles com 20 semanas (Figura 23).

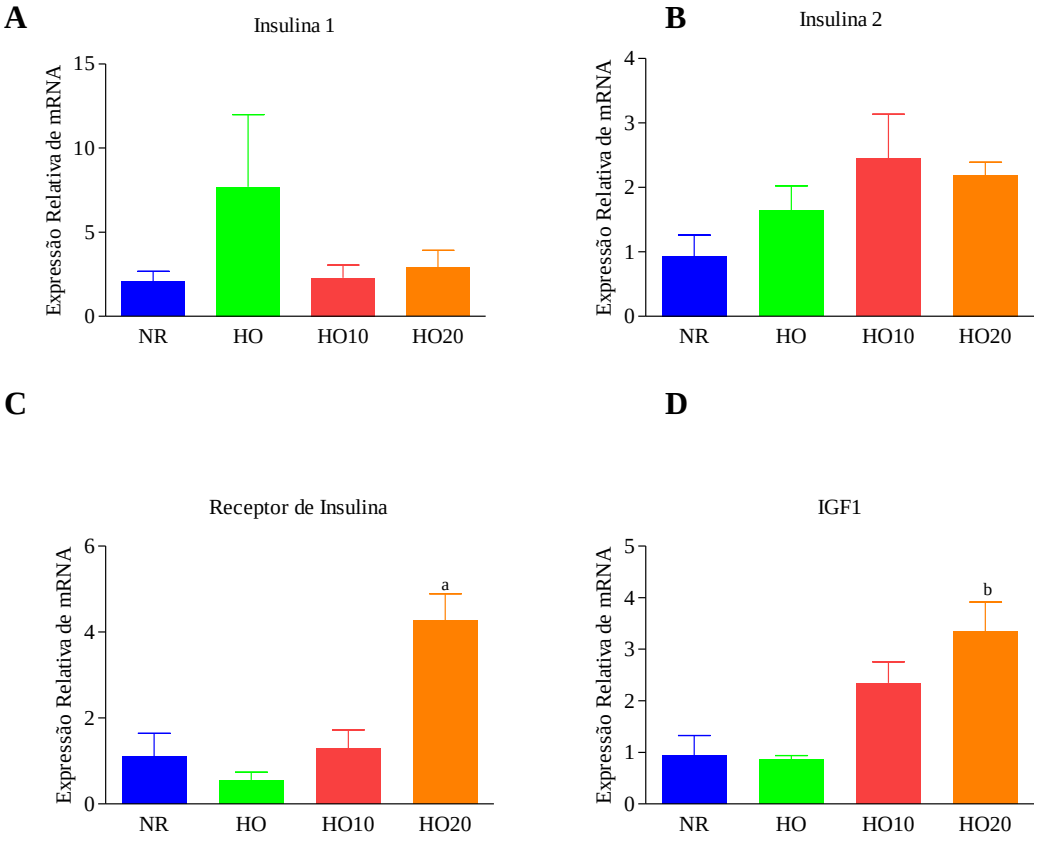


Figura 23: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em músculo gastrocnêmio de machos de proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Ins1*; (B) *Ins2*; (C) *Insr* [a]p<0,01 *versus* NR, HO e HO10; (D) *Igf1* [b]p<0,01 *versus* NR e HO. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A expressão gênica do gene *Ins2* não foi detectável no tecido adiposo branco retroperitoneal nos machos das proles com 20 semanas de idade. Os níveis de expressão dos genes *Ins1*, *Insr*, *Lep*, *Lepr* e do *Igf1* não mostraram diferença estatística entre os grupos analisados no tecido adiposo branco retroperitoneal de machos das proles com 20 semanas de idade (Figura 24).

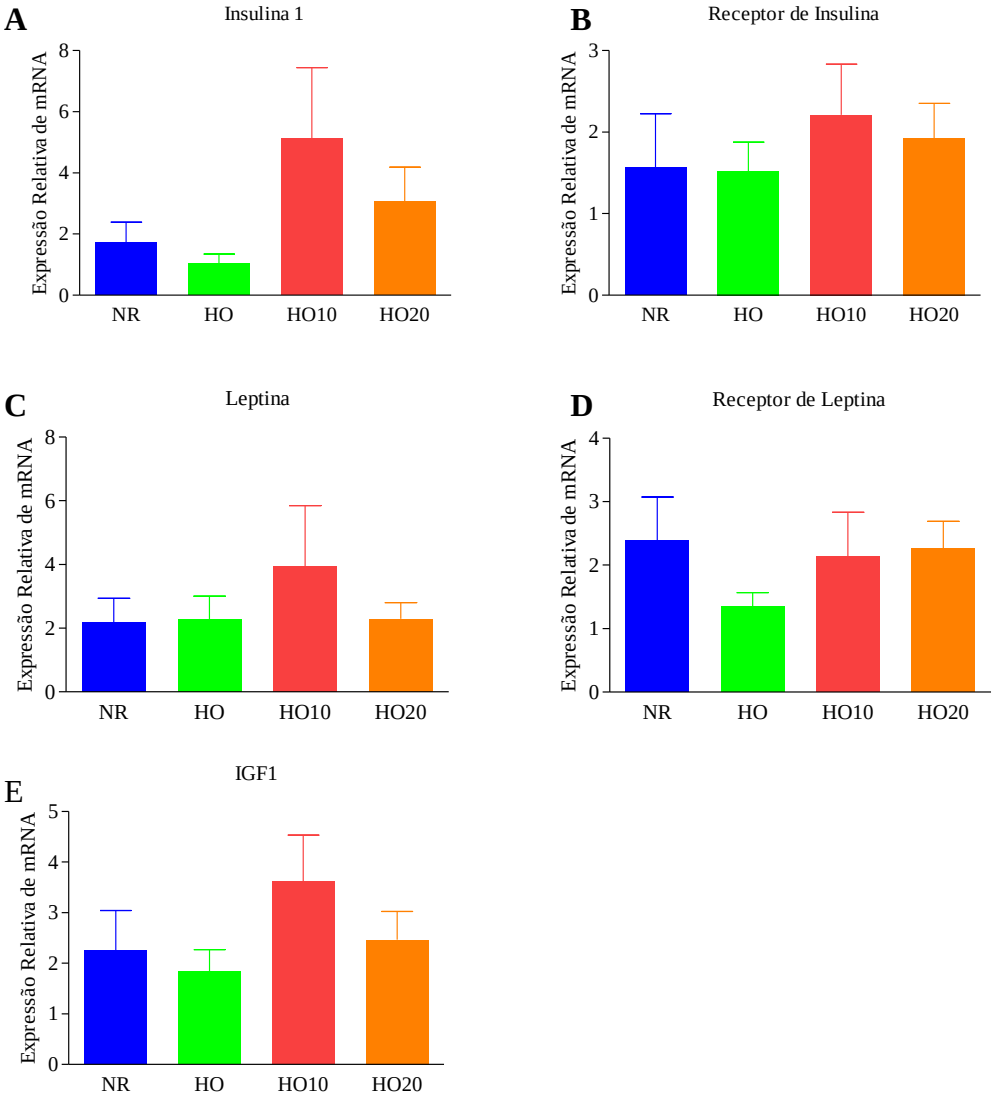


Figura 24: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em tecido adiposo branco retroperitoneal em machos de proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Ins1*; (B) *Insr*; (C) *Lep*; (D) *Lepr*; (E) *Igf1*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A expressão dos genes *Ins1* e *Ins2* também não foi detectável no fígado de fêmeas das proles com 20 semanas de idade. Os níveis de expressão gênica do *Insr* e de *Igf1*, avaliados no fígado de fêmeas das proles com 20 semanas de idade não apresentaram diferença estatística.

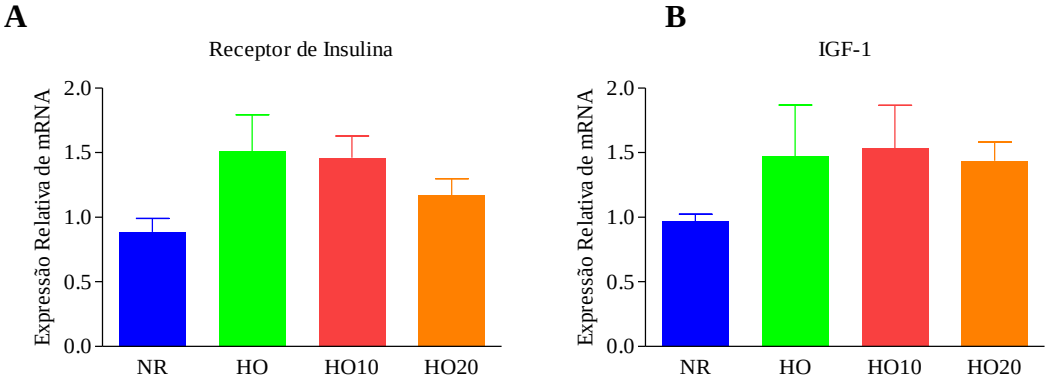


Figura 25: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em fígado de fêmeas de proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Insr*; (B). *Igf1*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Os níveis de expressão dos genes *Ins1* e *Ins2* não foram detectáveis no músculo de fêmeas das proles com 20 semanas de idade. A expressão gênica do *Insr* e do *Igf1*, avaliada no músculo de fêmeas das proles com 20 semanas de idade não apresentou diferença estatística entre os grupos analisados (Figura 26).

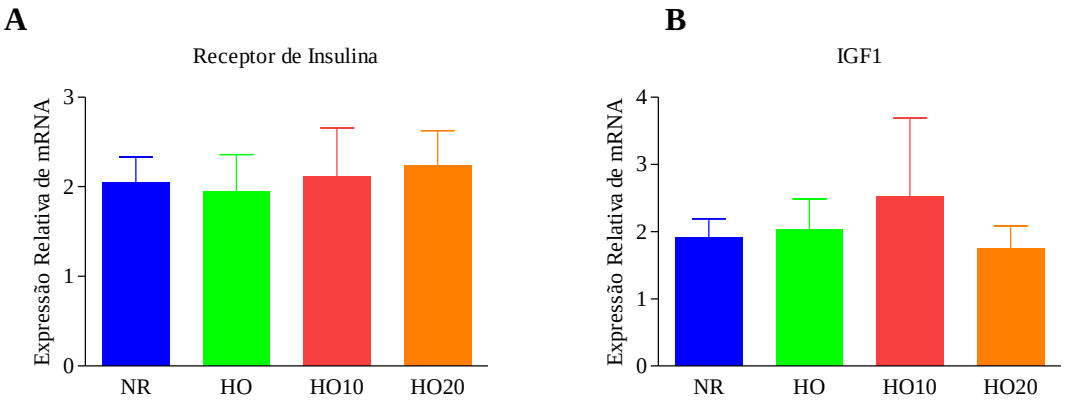


Figura 26: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em músculo gastrocnêmio de fêmeas de proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Insr*, (B) *Igf1*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A expressão gênica do gene *Ins2* também não foi detectável no tecido adiposo branco retroperitoneal nas fêmeas das proles com 20 semanas de idade. Os níveis de expressão do gene *Ins1* mostraram diminuídos nos grupos cujas mães receberam dieta hipossódica durante a gestação comparado ao grupo NR ($p<0,05$). Não houve diferença estatística nos genes *Insr* e *Lep* entre os grupos analisados no tecido adiposo branco retroperitoneal de fêmeas das proles com 20 semanas de idade. Os níveis de expressão do *Lepr* mostraram diminuídos nas proles dos grupos HO, HO10 e HO20 comparado ao grupo NR. O nível de expressão do *Igf1* no grupo HO20 foi menor comparado com o grupo NR analisados no tecido adiposo branco retroperitoneal de fêmeas das proles com 20 semanas de idade (Figura 27).

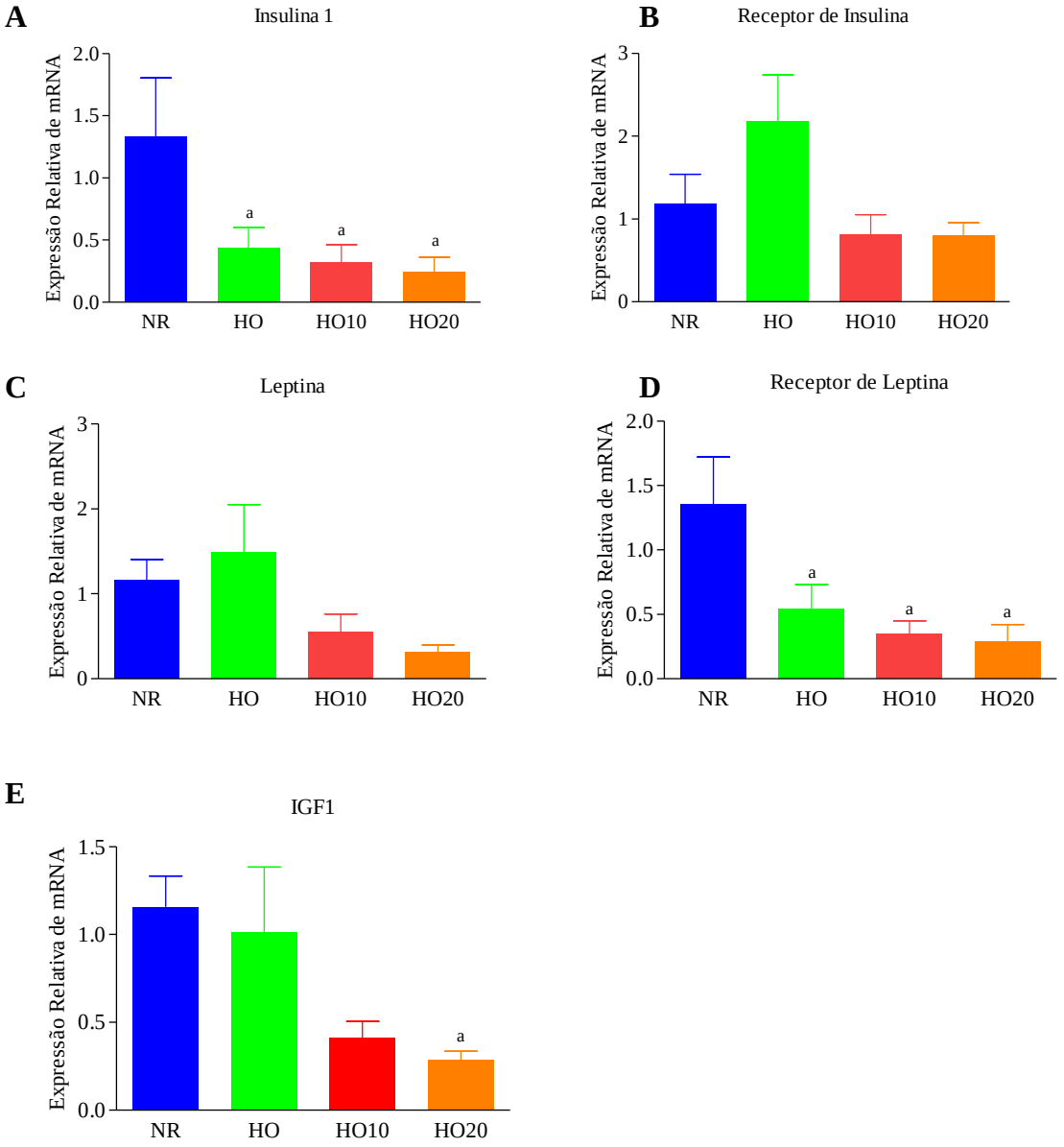


Figura 27: Expressão gênica avaliada através de qRT-PCR em tecido adiposo branco retroperitoneal em fêmeas de proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) *Ins1* $^{a}p<0,05$ *versus* NR; (B) *Insr*; (C) *Lep*; (D) *Lepr* $^{a}p<0,05$ *versus* NR; (E) *Igf1* $^{a}p<0,05$ *versus* NR. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média dos valores obtidos em cinco experimentos independentes, realizados em duplicata. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

4.2.20 Metilação do DNA no promotor dos genes

O perfil da metilação do DNA na região promotora dos genes foi analisado separadamente por ilha CpG e pela média de todas as ilhas CpGs avaliadas. O resultado da metilação do DNA foi informado em porcentagem indicando quanto de metilação há em média em todas as ilhas CpG analisadas.

A média da porcentagem de metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* foi analisada no fígado de neonatos machos. Verificou-se menor porcentagem de metilação de DNA no promotor do gene *Ins1* no grupo HO10 comparado aos grupos NR e HO, no gene *Ins2* comparado ao grupo HO e no *Insr* comparado ao grupo NR (Figura 28).

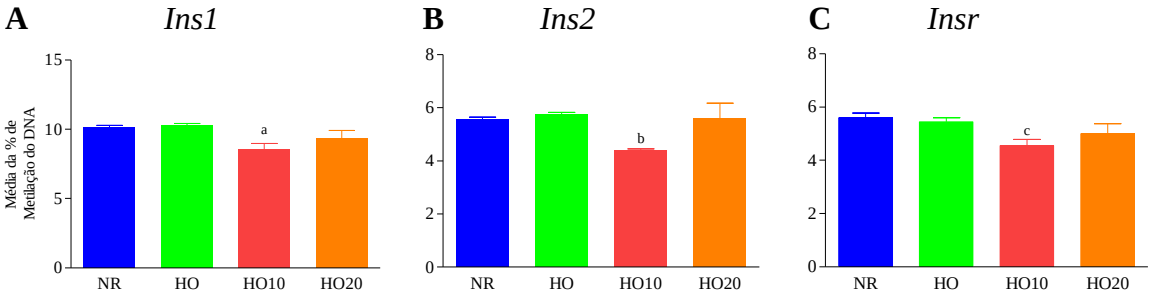


Figura 28: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado de machos das proles neonatais cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*; $^{a}p<0,05$ *versus* NR e HO. (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins2*; $^{b}p<0,05$ *versus* HO; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*; $^{c}p<0,05$ *versus* NR. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A porcentagem de metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* foi menor no fígado de fêmeas neonatas dos grupos HO10 e HO20 em comparação aos grupos NR e HO. A porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr* foi menor no fígado de fêmeas neonatas do grupo HO20 comparado aos demais grupos (Figura 29).

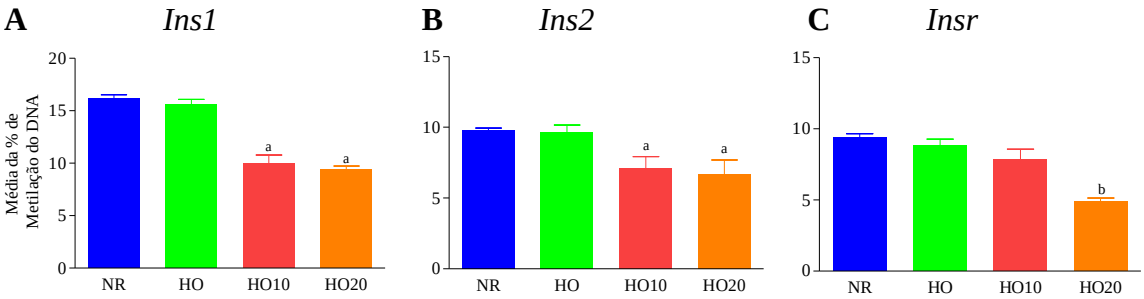


Figura 29: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado de fêmeas das proles neonatais cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*; $^{a}p<0,05$ *versus* NR e HO. (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins2*; $^{a}p<0,05$ *versus* NR e HO; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*; $^{b}p<0,05$ *versus* NR, HO e HO10. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1* e *Ins2* no fígado dos machos com 20 semanas de idade do grupo HO20 foi maior em relação aos demais grupos. Não houve diferença do grau da metilação no gene *Insr* (Figura 30).

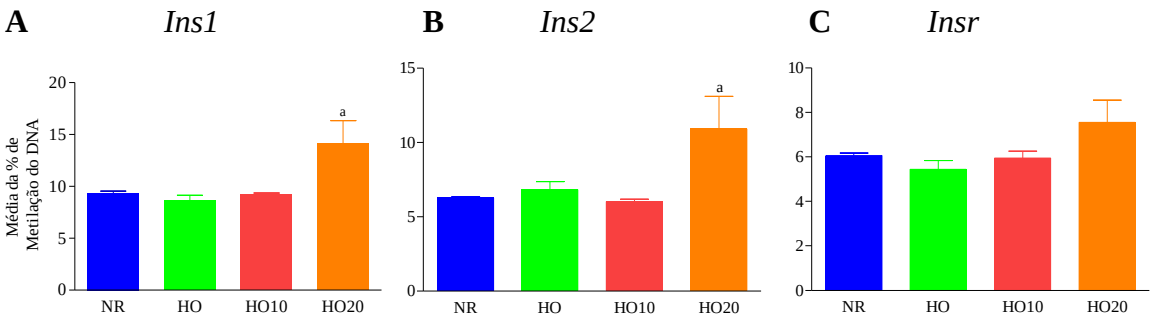


Figura 30: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado dos machos das proles com 20 semanas de vida, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*, [a] $p<0,05$ *versus* NR, HO e HO10. (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins2*, [a] $p<0,05$ *versus* NR, HO e HO10; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey* (A e C) e *Newman-Keuls* (C)

Não houve diferença do grau da metilação no gene *Ins1*. A porcentagem de metilação do DNA no promotor dos genes *Ins2* e *Insr* no músculo dos machos das proles com 20 semanas do grupo HO10 foi menor comparado aos grupos NR e HO20 (Figura 31).

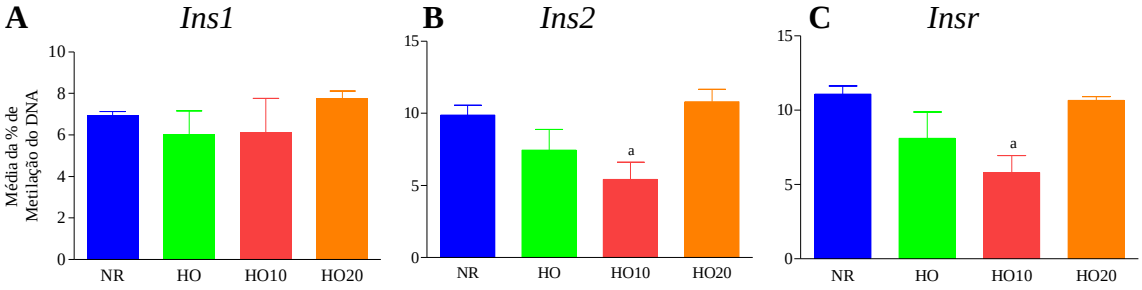


Figura 31: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no músculo gastrocnêmio dos machos das proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins2*; $^{a}p<0,05$ *versus* NR e HO20; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*, $^{a}p<0,05$ *versus* NR e HO20. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey* (A e C) e *Newman-Keuls* (B)

O perfil da metilação do DNA no promotor dos nos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no tecido adiposo retroperitoneal em machos com 20 semanas não foi diferente entre os grupos (Figura 32).

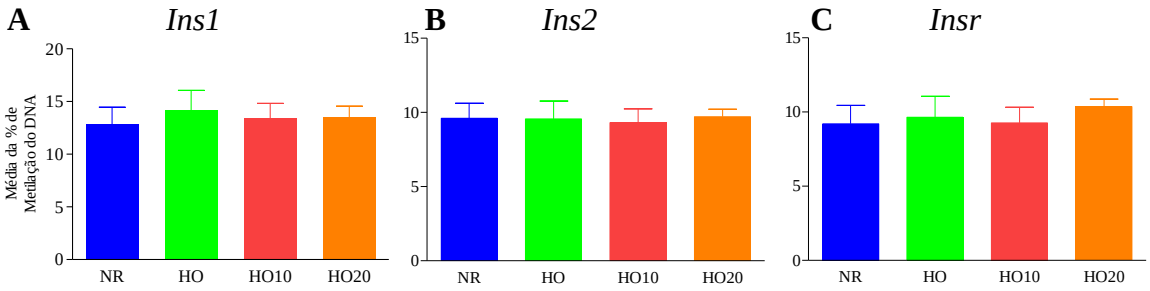


Figura 32: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no tecido adiposo retroperitoneal da prole de machos com 20 semanas de vida, cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins2*; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Não houve diferença na metilação do DNA nos promotores dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado das fêmeas das proles com 20 semanas de idade (Figura 33).

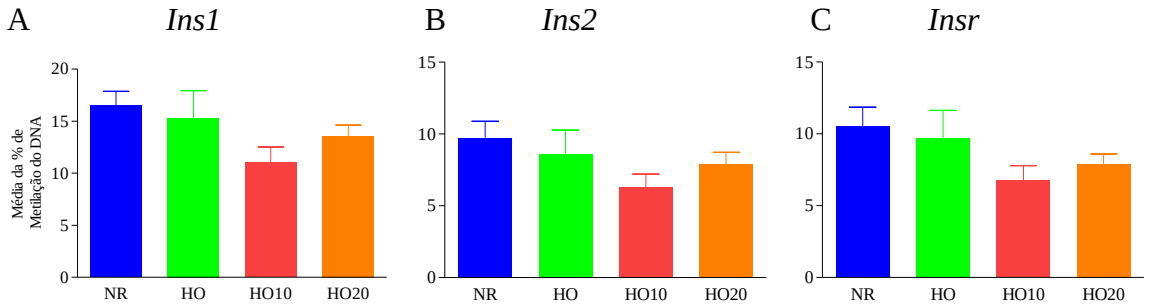


Figura 33: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no fígado das fêmeas das proles com 20 semanas de vida e cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins2*; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Assim como no fígado, fêmeas com 20 semanas de idade não diferiram no grau de metilação de DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no músculo gastrocnêmio (Figura 34).

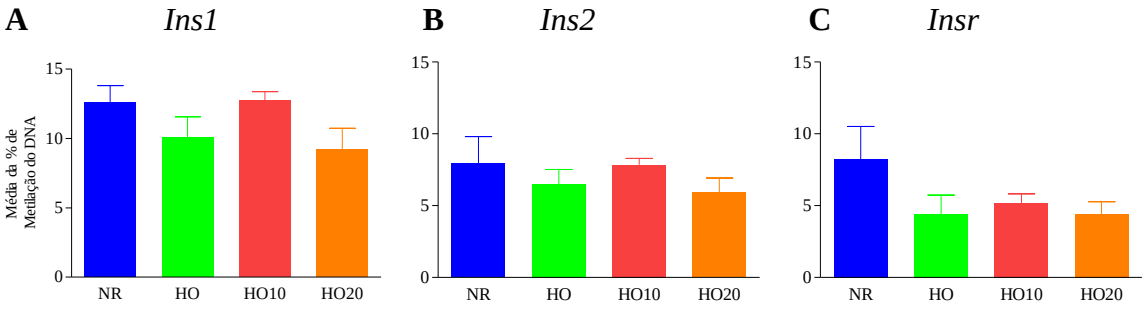


Figura 34: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no músculo das fêmeas das proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins*2; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Também não houve diferença na metilação do DNA nos promotores dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no tecido adiposo das fêmeas com 20 semanas de idade (Figura 35).

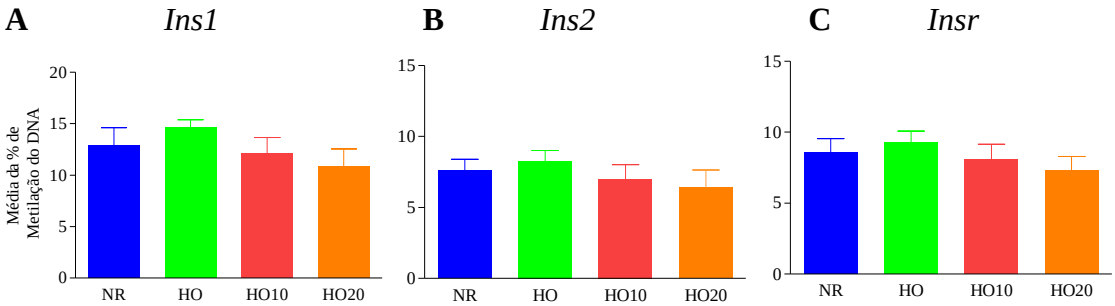


Figura 35: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Ins1*, *Ins2* e *Insr* no tecido adiposo retroperitoneal das fêmeas das proles com 20 semanas de idade cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Ins2*; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Insr*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A análise da porcentagem de metilação do DNA no promotor dos genes *Lep* e *Lepr* no tecido adiposo retroperitoneal tanto em machos quanto em fêmeas com 20 semanas de idade não apresentou diferença estatística (Figura 36).

Machos

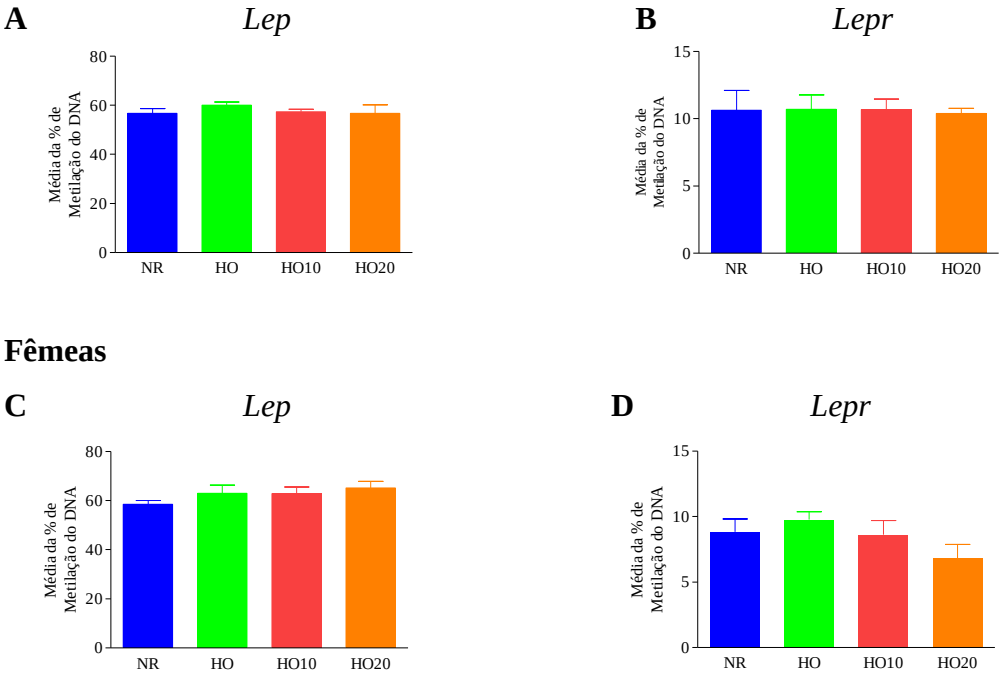


Figura 36: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Lep* e *Lepr* no tecido adiposo retroperitoneal dos machos e das fêmeas de proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Lep* em machos; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Lepr* em machos; (C) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Lep* em fêmeas; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Lepr* em fêmeas Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1* no fígado em neonatos machos dos grupos HO e HO20 foi maior comparado aos grupos NR e HO10. A porcentagem de metilação no promotor do gene *Igf1r* do grupo HO10 foi menor comparado aos grupos NR e HO (Figura 37).

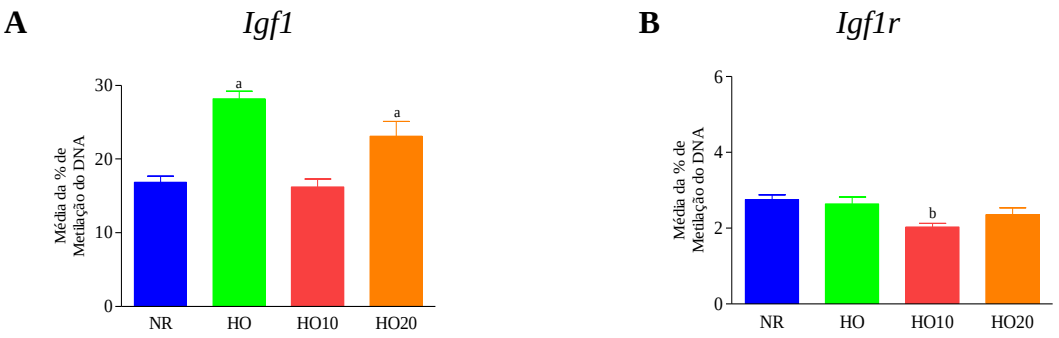


Figura 37: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado de neonatos machos. Cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1* $^{a}p<0,05$ *versus* NR e HO10; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1r* $^{b}p<0,05$ *versus* NR e HO. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

A metilação do DNA no promotor do gene *Igf1*, no fígado das fêmeas neonatais não foi diferente entre os grupos. A porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1r* no fígado em neonatos fêmeas dos grupos HO10 e HO20 foi menor comparado aos grupos NR e HO (Figura 38).

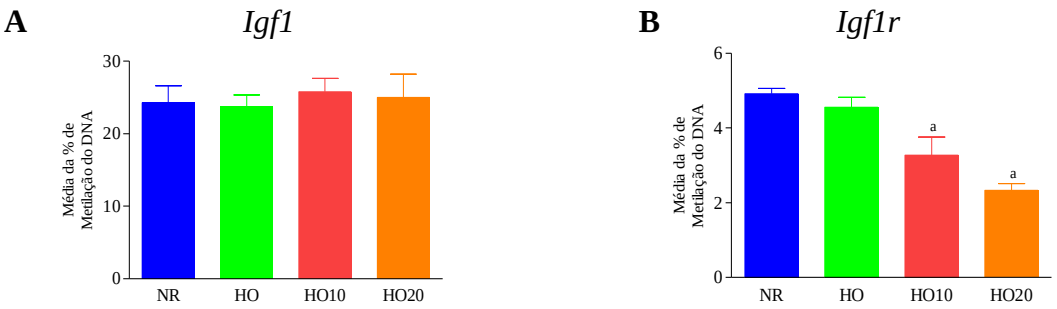


Figura 38: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado de neonatos fêmeas cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1r* [a] $p<0,05$ *versus* NR e HO. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Não houve diferença na metilação do DNA no promotor do gene *Igf1*, no fígado dos machos das proles com 20 semanas de idade. A porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1r* no fígado nos machos com 20 semanas do grupo HO20 foi maior comparado aos grupos NR, HO e HO10 (Figura 39).

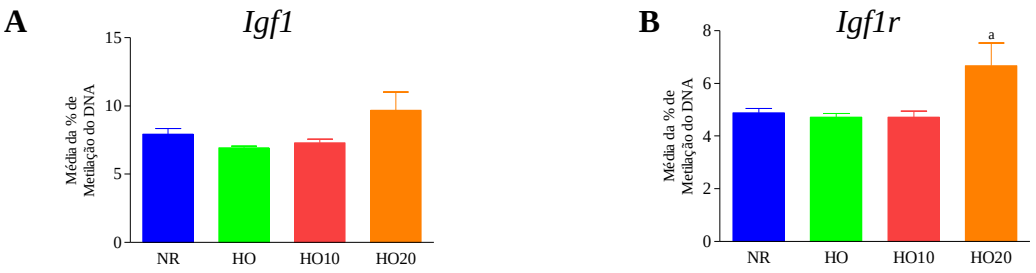


Figura 39: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado dos machos das proles com 20 semanas de vida cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1r* $^{a}p<0,05$ *versus* NR, HO e HO10. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey* (A) e *Newman-Keuls* (B)

A análise da porcentagem de metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado em fêmeas com 20 semanas de idade não apresentou diferença estatística entre os grupos (Figura 40).

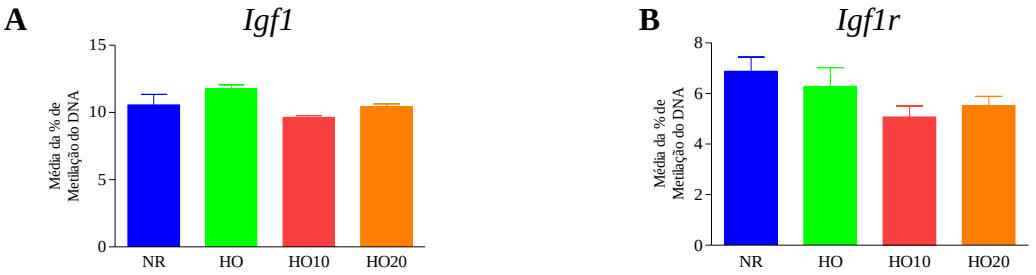


Figura 40: Perfil da metilação do DNA no promotor dos genes *Igf1* e *Igf1r* no fígado de fêmeas das proles com 20 semanas de idade cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1*; (B) Média da porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1r*. Os valores são expressos como média ± erro padrão da média. Cada grupo de dieta foi composto de 5 a 8 animais. A análise estatística foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido de pós-teste de *Tukey*

Foi observada uma correlação direta entre a concentração de IGF-1 sérico e o peso ao nascimento. Também foi observada uma correlação inversa entre a porcentagem de metilação do promotor do gene *Igf1* com o peso ao nascimento. Há um decréscimo de 5% da metilação do DNA para o aumento de um grama de peso corpóreo ao nascimento (Figura 41).

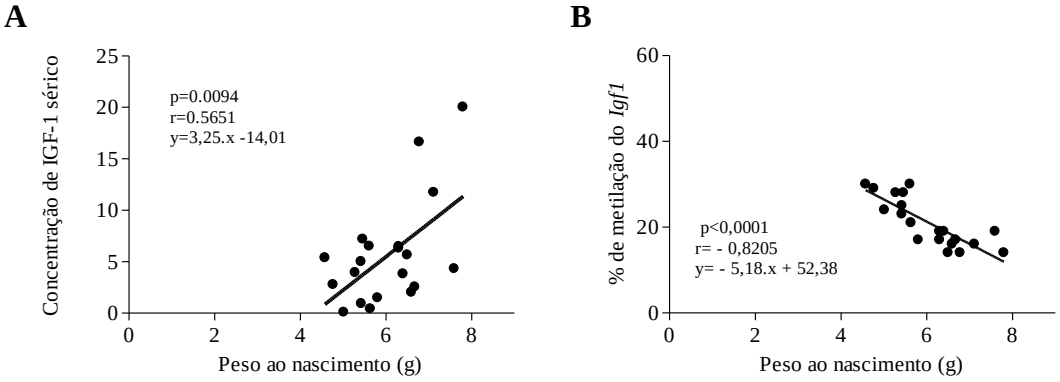


Figura 41: Correlações entre o IGF-1 e o peso ao nascimento em neonatos machos cujas mães receberam dieta normossódica (NR), hipossódica (HO), hipossódica somente na primeira metade da gestação (HO10) ou hipossódica somente na última metade da gestação (HO20). (A) Correlação entre os níveis de IGF-1 sérico e o peso ao nascimento p=0,0094, r=0,5651; (B) Correlação entre a porcentagem de metilação do DNA no promotor do gene *Igf1*e o peso ao nascimento p<0,0001, r= -0,8205. Número de animais analisados n=20. A análise estatística foi realizada através do teste de correlação de *Pearson*

5 DISCUSSÃO

Este estudo observou vários resultados que permitem uma melhor compreensão dos efeitos da baixa ingestão de sódio durante a gestação em mães, neonatos e prole adulta. Primeiro, o baixo peso ao nascimento observado em resposta a ingestão de dieta hipossódica durante a gestação como evidenciado em estudos anteriores (Alves-Rodrigues et al., 2013; Vidonho et al., 2004; Lopes et al., 2008) é principalmente devido à restrição de sal na segunda metade da gestação tanto em machos quanto em fêmeas da prole. Segundo, a restrição de crescimento fetal observada pelo menor comprimento naso-anal é um efeito da restrição de sal durante a primeira metade da gestação. Terceiro, o metabolismo de glicose e insulina em proles com 12 semanas de idade é influenciada apenas pela restrição de sódio durante a gestação inteira. Quarto, a resistência à insulina e a intolerância à glicose observada em proles com 20 semanas de idade é um efeito da ingestão de restrição de sal durante os estágios iniciais da gestação. O presente estudo também forneceu evidências adicionais com respeito aos mecanismos epigenéticos que podem alterar o fenótipo da prole neste modelo.

A vantagem deste estudo é o desenho do protocolo experimental que permitiu identificar o período gestacional no qual a restrição de sódio induz alterações nas mães bem como alterações nas proles. Trabalhos anteriores foram realizados usando diferentes períodos de dieta com baixo teor de sal. Alguns trabalhos incluíram semanas anteriores ao acasalamento, durante a gestação e lactação (da Silva et al., 2003, Vidonho et al., 2004; Alves-Rodrigues et al., 2013; Lopes et al., 2008). Essa variação na exposição dificulta uma conclusão definitiva sobre o período exato em que a dieta hipossódica afeta o fenótipo da prole.

Foi observado de que o consumo da dieta hipossódica na segunda metade da gestação foi menor que na primeira metade da gestação no grupo materno. Este resultado está de acordo com o estudo de Ganguli e colaboradores que demonstraram que quanto menor a concentração de sódio na dieta, menor consumo pelas ratas no final da gestação. Este menor consumo da dieta hipossódica observado no presente estudo pode ser responsável pelo menor ganho de peso corpóreo materno na terceira semana de gestação e também pelo menor peso corpóreo da prole ao nascimento. Porém, como não houve diferença no consumo de ração no grupo que foi alimentado com dieta

hipossódica durante toda a gestação não há suporte para tal afirmação. O menor consumo de dieta materna na terceira semana de gestação no grupo HO20 pode ser decorrente de mudança na palatabilidade. Para a comprovação ou não desta hipótese, há necessidade de estudos adicionais.

O menor ganho de peso corpóreo na última semana de gestação em ratas alimentadas com dieta hipossódica durante toda a gestação ou somente na segunda metade da gestação pode ser relacionado à restrição de crescimento intrauterino na prole, como evidenciado pelo baixo peso ao nascimento. O tamanho da prole e a relação entre machos e fêmeas não influenciou o peso corpóreo materno. O menor ganho de peso na terceira semana de gestação nos grupos HO e HO20 não deve ser devido a um menor consumo de ração que somente foi observado no grupo HO20. Modificações no balanço energético no grupo HO e na volemia nos grupos HO e HO20, embora não avaliados, pode ter contribuído para o menor ganho de peso na terceira semana de gestação.

O baixo peso ao nascimento tanto em machos quanto em fêmeas nos grupos HO e HO20, possivelmente é decorrente da restrição no consumo de sal na segunda metade da gestação uma vez o mesmo não foi observado no grupo HO10.

Estudos anteriores confirmam que a ingestão de dieta hipossódica está associada a um menor peso ao nascimento em ambos os sexos (Alves-Rodrigues et al., 2013, Vidonho et al., 2004, Lopes et al., 2008). Esse estudo não foi planejado para desvendar o mecanismo deste achado. Entretanto, o baixo peso ao nascimento é observado em algumas condições como: desnutrição materna, hipoxia materna, baixa perfusão uterina e comprometimento na função da placenta. Em estudo anterior, foi observado que a dieta hipossódica durante a gestação não compromete a perfusão uterina (Leandro et al., 2008). Sabendo que o conteúdo proteico e calórico das dietas normo e hipossódica é o mesmo, a desnutrição materna também pode ser excluída baseada na ausência de diferenças na ingestão de ração entre os grupos HO e HO20 comparada com o grupo NR. A restrição de sal na segunda metade da gestação não explica o baixo peso ao nascimento observado nas proles HO e HO20 já que o conteúdo de sal na dieta hipossódica do nosso modelo é consistente com um desenvolvimento normal do feto (Ganguli et al., 1969; Bird & Contreras, 1987). Outras observações deste estudo indicam efeitos adversos da restrição de sal na segunda metade da gestação como o maior número de natimortos, canibalismo pelas mães, malformação da cauda e do olho nas proles.

O consumo de dieta com conteúdo normal de sal parece ser importante para um crescimento fetal normal independentemente do ganho de peso. Esta afirmação é baseada no achado de menor comprimento naso-anal em recém-nascidos dos grupos HO, HO10 e HO20 ao mesmo tempo que somente foi observado baixo peso ao nascimento nos grupos HO e HO20.

Muitos trabalhos têm mostrado os efeitos adversos de um fenômeno conhecido como *catch-up growth*. O *catch-up growth* é um crescimento acelerado de recém-nascidos de baixo peso e que igualam o seu peso comparado ao grupo controle após algum tempo de observação. Ao final da primeira semana de vida foi constatado que houve um *catch-up growth* apenas nas proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante toda a gestação. Ao final de 12 semanas de observação não houve diferença de peso corpóreo entre os grupos. Isto indica que o grupo HO20 que também nasceu com baixo peso teve um *catch-up growth* mais tardio do que o observado no grupo HO. Um aspecto interessante cujo significado não está claro é o menor comprimento observado ao nascimento e o crescimento lento até a terceira semana de vida na prole de mães HO10. O mecanismo de *catch-up growth* não foi esclarecido neste estudo. Pode-se afirmar, no entanto, que o *catch-up growth* na prole HO não foi decorrente de maior consumo alimentar. O maior consumo hídrico da terceira a décima segunda semana de vida em machos e fêmeas de proles cujas mães foram alimentadas com dieta hipossódica é um resultado cujo mecanismo ainda precisa ser esclarecido. Talvez seja interessante realizar medida de expressão de transportadores de sódio, vasopressina, aldosterona e aquaporina para tentar explicar esse aumento de ingestão hídrica. Já é bem difundido que o rápido ganho de peso e de tamanho pós-natal está associado ao aumento da susceptibilidade à obesidade, intolerância à glicose e hipertensão (Huxley et al., 2000; Jimenez-Chillaron et al., 2006). Por outro lado, o *catch-up growth* pode ser considerado uma adaptação fisiológica que permite a prole atingir o seu peso e/ou altura geneticamente programados após um período de retardo no crescimento (Hales & Barker, 2001; Morrison et al., 2009). O conjunto destes resultados permite conjecturar que a restrição no consumo de sal durante a gestação, independentemente em qual período isto ocorreu, compromete o desenvolvimento intrauterino, com *catch-up growth* secundário, predispondo a prole a alterações na vida adulta.

A ingestão de dieta com baixo ou alto conteúdo de sódio durante o período pré ou pós-natal é fator estressante tanto para as mães quanto para as proles (McBride et al., 2008). McBride e colaboradores mostraram um aumento da suprarrenal em resposta ao

estresse causado pela dieta hipossódica materna durante a gestação e/ou lactação da prole. Contudo, os resultados do presente estudo não confirmam o observado por estes autores. Essa diferença de resultados pode ser devido à porcentagem do conteúdo de sódio na dieta materna. Já que o grupo de McBride utilizou um valor de sódio 20% menor que no atual trabalho.

O *catch-up growth* é mediado em parte pelo rápido aumento da adiposidade (Vickers, 2007). O maior índice de adiposidade observado nos machos das proles com 12 semanas de idade do grupo HO pode ser consequência do *catch-up growth* (Morrison et al., 2010; Vickers, 2007). Essa obesidade apresentada foi transitória uma vez que não foi observada nas proles com 20 semanas de idade. A maior massa dos tecidos adiposos não foi decorrente de um maior consumo de ração, sugerindo que modificações no metabolismo energético possam estar envolvidas. Contudo, os resultados do atual estudo não corroboram com os de Lopes e colaboradores que não evidenciaram obesidade nos machos de proles da mesma idade, mas mostraram aumento da leptina sérica que é conhecida como marcador de massa de tecido adiposo (Priego et al., 2009). De fato, é postulado que os efeitos periféricos da leptina no tecido adiposo branco, podem ajudar a regular o peso corpóreo (Priego et al., 2009). O IGF-1 é um dos mais importantes fatores de crescimento no desenvolvimento do tecido adiposo (Holzenberger et al., 2001). Assim, pode-se sugerir que a obesidade observada nestes animais seja devido ao aumento de quase 50% de IGF-1 sérico nesta idade em comparação com os outros grupos. Um aspecto que merece ser salientado é o *catch-up growth* tardio no grupo HO20 que deve ser decorrente de um aumento na massa magra.

Com bases nestes resultados foi possível evidenciar que as alterações fenotípicas nos machos das proles são mais evidenciadas com doze semanas de idade cujas mães foram alimentadas com dieta hipossódica durante toda a gestação e muitas dessas alterações não persistiram até vinte semanas de idade. Nesta idade o grupo influenciado pela dieta materna foi o grupo em que as mães receberam dieta hipossódica na primeira metade da gestação. Já as fêmeas mostraram o oposto dos machos, as proles de mães alimentadas na primeira metade da gestação foram que mais apresentaram alterações fenotípicas e que também não foram persistentes até vinte semanas de idade. Os resultados do presente estudo demonstram que o desenvolvimento de um fenômeno em determinado período não quer dizer que este seja persistente. E que detectar uma diferença em um determinado momento não é valido para outros momentos.

Gluckman e colaboradores (2005) propuseram que quando há uma alteração no ambiente intrauterino, por exemplo, restrição de nutrientes ou altos níveis de glicocorticoides, os fetos farão adaptações para melhorar imediatamente suas chances de sobrevivência. Entretanto, se as mudanças ambientais persistirem o feto é forçado a fazer adaptações irreversíveis que podem ou não ser imediatamente benéficas, mas que podem se manifestar na vida adulta. Intrigantemente, há evidência que o contrário também pode ocorrer. Ratas alimentadas com dieta rica em gordura durante a gestação têm prole com alteração na função endotelial e hipertensão quando adultos. Se a prole também for alimentada com dieta rica em gordura depois do nascimento, a disfunção endotelial, mas não a hipertensão, é prevenida (Khan et al., 2004).

Os achados do presente trabalho são consistentes com outras pesquisas que demonstraram que a exposição materna a determinados fatores ambientais e dietéticos durante o desenvolvimento embrionário precoce pode influenciar o fenótipo da prole, bem como o risco de desenvolver doença na vida adulta (De Boo & Harding, 2006; Godfrey & Barker, 2001; Muhlhausler et al., 2009; Zandi-Nejad et al., 2006).

O comportamento da glicemia nas proles mostrou duas características interessantes. A primeira foi que houve uma evidente influência do consumo de dieta hipossódica durante a gestação sobre a glicemia tanto em neonatos quanto na prole adulta com 12 e 20 semanas de idade. O período no qual as mães consumiram dieta hipossódica influenciou a glicemia de maneira variável em função da idade da prole. A segunda característica foi o claro dimorfismo sexual. A glicemia nas fêmeas das proles não foi modificada em função de consumo de dieta hipossódica durante a gestação.

A maior glicemia em machos neonatos do grupo HO20 pode ser decorrente de uma resistência à insulina, uma vez que a insulinemia não foi diferente da observada nos demais grupos.

A menor concentração de leptina sérica em todos os grupos de neonatos de mães alimentadas com dieta hipossódica em qualquer período da gestação é provavelmente devido à diminuição dos níveis de leptina materna já que a leptina não está presente logo após o nascimento e atravessa a barreira placentária (Stocker et al., 2005). O efeito da restrição de sal é possivelmente um efeito de longa duração já que desde o nascimento as mães do grupo HO10 não estavam consumindo dieta hipossódica durante os últimos dez dias. Esses achados estão de acordo com o trabalho de Hauguel e colaboradores (2006) que mostraram que crianças que nascem pequenas para a idade

gestacional apresentam baixos níveis de leptina no sangue e no cordão umbilical e que estes achados estão associados com o rápido ganho de peso pós-natal e uma predisposição para desenvolver síndrome metabólica na vida adulta.

Um aspecto que merece ser comentado é que embora os neonatos tenham sido sacrificados menos de 24 horas após o nascimento, não foi possível determinar e coletar as amostras de sangue de todos os animais em jejum, pois alguns já se encontravam mamando. Assim, essas medidas basais analisadas nos neonatos podem ter sido influenciadas por variação na condição de jejum.

Os machos da prole do grupo HO apresentou baixo peso ao nascimento, teve *catch-up growth* e com doze semanas de vida apresentou obesidade, intolerância à glicose, maior glicemia de jejum, resistência à insulina evidenciada pelo maior índice HOMA-IR e maior concentração de IGF-1 e de peptídeo-C.

A diferença na massa de órgãos se limitou ao coração, rins e à suprarrenal de machos da prole com 12 semanas de idade. Isto indica a existência de um dimorfismo sexual e um fenômeno variável com a idade. O significado das diferenças constatadas é matéria ainda não esclarecida.

Estas características observadas nos machos da prole do grupo HO com doze semanas de idade não se mantiveram até vinte semanas de idade. A importância desta observação reside no fato de que resultados verificados em determinado instante não necessariamente são detectados em outros momentos.

Uma das formas de avaliar a função das células-β é a dosagem da própria insulina. O teste, para esta finalidade, tem utilidade limitada, pois a insulina apresenta meia-vida curta (4 minutos). Assim, a insulinemia plasmática não reflete de maneira fidedigna a capacidade de secreção das células-β pancreáticas. Outra forma de avaliar a capacidade de secreção da célula-β é dosar o peptídeo-C sérico. Este é um peptídeo que conecta as cadeias A e B na pró-insulina e facilita seu processamento à insulina biologicamente ativa nos grânulos secretórios das ilhotas pancreáticas. Após a clivagem da pró-insulina, o peptídeo-C intacto permanece armazenado com a insulina nesses grânulos e é subsequentemente secretado com a insulina, em quantidades equimolares (Palmer et al., 2004). Sendo assim, o peptídeo-C pode ser considerado como um marcador independente da secreção de insulina (Rodacki et al., 2008). Entretanto, em algumas situações, a concentração sérica de peptídeo-C não é proporcional às taxas de secreção de insulina. Um exemplo disso é a disfunção renal. Cerca de 85% do peptídeo-

C é metabolizado pelos rins, sendo o restante excretado intacto pela urina. Uma queda da função renal implica redução da metabolização do peptídeo C, com elevação de seus níveis séricos (Covic et al., 2000). A dosagem de peptídeo-C tem algumas vantagens em relação à determinação da insulina plasmática na avaliação funcional da célula-β. Além de ter meia-vida mais longa (30 minutos), o que implica menor flutuação de níveis séricos, não sofre metabolização hepática significativa e possui *clearance* mais previsível. Por esses motivos, a dosagem de peptídeo-C tem sido considerada como o método mais adequado, aceito e clinicamente validado para avaliação da função das células-β pancreáticas (Rodacki et al., 2008).

A resistência à insulina foi observada nos machos da prole dos grupos HO com 12 semanas de idade. Esse resultado confirma os achados de Vidonho e colaboradores que demonstraram resistência à insulina nos machos da prole com doze semanas de vida de mães alimentadas com dieta hipossódica desde as oito semanas de idade, durante a gestação e lactação. No atual estudo a prole foi acompanhada por mais tempo tendo sido observado uma maior glicemia no ITT em machos das proles dos grupos HO e HO10, maior concentração de insulina e HOMA-IR no grupo HO10 sugerindo que há uma menor sensibilidade à insulina nesses animais. A resistência à insulina nos machos da prole do grupo HO pode estar associada ao baixo peso ao nascimento e no HO10 ao menor tamanho ao nascimento. Os resultados relativos ao metabolismo da glicose e insulina foram semelhantes nas fêmeas das proles de mães alimentadas com dieta hipossódica durante a gestação. Assim, estes resultados corroboram com a hipótese de Barker de que baixo peso e tamanho ao nascimento aumenta o risco de desenvolver doenças crônicas (Barker et al., 1989). Esses importantes achados sugerem que o consumo de dieta hipossódica na primeira metade da gestação possa ser a responsável pelo desenvolvimento da intolerância à glicose e resistência à insulina nas proles adultas.

Sabe-se que os principais mediadores hormonais do crescimento fetal são a insulina e fatores de crescimento semelhantes à insulina. Estes, por sua vez regulados pelo fornecimento de nutrientes ao feto (Oliver et al., 2002). Os resultados do atual estudo confirmam esta informação, pois embora não tenham atingido significância estatística a concentração sérica de insulina e IGF-1 foram menor nos animais dos grupos HO e HO20 (machos e fêmeas) que nasceram com baixo peso. Outro dado que sustenta essa informação foi a correlação direta entre peso ao nascimento e concentração sérica de IGF-1 O aumento da concentração sérica de IGF-1 com a idade no presente estudo está de acordo com os achados de Sferruzzi-Perri (2011).

A insulina é secretada pelas células-β pancreáticas e tem ação significante na homeostase da glicose nos animais adultos. Por outro lado, a expressão de insulina durante a embriogênese tem sido relatada em tecidos extrapancreáticos como, por exemplo, o fígado (Giddings & Carnaghi, 1989). Nossos resultados estão de acordo com o recente trabalho publicado de Murakami-Kawaguchi e colaboradores (2013) que mostram que os genes *Ins1* e *Ins2* não são expressos no fígado de camundongos machos e fêmeas adultos. Assim, como o mRNA de *Ins1* não detectado no fígado ao nascimento também está de acordo com trabalho acima citado (Murakami-Kawaguchi et al., 2013). Diferentemente do observado em estudos prévios (Alarcón et al., 1998), no presente estudo observou-se que a *Ins2* é expressa no fígado de neonatos. Uma possível explicação para o conflito entre os achados neste e em outros estudos (Giddings & Carnaghi, 1989; Murakami-Kawaguchi et al., 2013) pode ser uma diferença entre espécies. No entanto, trabalhos demonstram que o mRNA de *Ins1* e *Ins2* são expressos no fígado fetal nos dias embrionários 16.5 e 18.5 tanto nos camundongos quanto nos ratos (Murakami-Kawaguchi et al., 2013; Alarcón et al., 1998; Giddings & Carnaghi, 1989). Questões pendentes incluem: qual é o papel da insulina no fígado neonatal? Foram desenvolvidos camundongos duplo *knockout* para *Ins1* e *Ins2* (Duvillié et al., 1997). A prole duplo *knockout* para *Ins1 e Ins2* (deficientes de insulina) não apresentam glicosúria ao nascimento, mas logo após a lactação eles desenvolvem diabetes com cetoacidose e esteatose hepática e morrem dentro de 48 horas, sugerindo que a prole apresenta níveis normais de insulina e glicemia antes do nascimento por causa da insulina materna. No presente estudo, o receptor de insulina foi expresso constitutivamente no fígado neonatal e no adulto confirmando achados anteriores (Murakami-Kawaguchi et al., 2013). A insulina favorece a remoção de glicose da circulação pelos tecidos periféricos que têm receptores de insulina, como músculo e tecido adiposo. Embora a insulina não aumente a captação de glicose no fígado, este hormônio regula muitas funções metabólicas neste órgão, como estimular a síntese de glicogênio e inibir a gliconeogênese, controlando a glicemia. O músculo é responsável pela mobilização de 75% da glicose disponível através da translocação do transportador de glicose dependente de insulina. O tecido adiposo também participa desta retirada de glicose da circulação, induzida por insulina, embora este hormônio também esteja regulando outras funções como a indução da lipogênese e inibição da lipólise (Saltiel & Kahn, 2001).

A metilação do DNA, um fenômeno epigenético tem sido sugerido como um mecanismo por meio do qual os nutrientes maternos afetam o fenótipo da sua prole. Durante o período fetal, os padrões de metilação do DNA sexo e órgãos-específicos são estabelecidos através de reprogramação epigenética (Waterland & Jirtle, 2004). No entanto, os padrões de metilação do DNA estabelecidos não são imutáveis e podem ser modificados durante a vida pelo ambiente (Nuyt & Szyf, 2007). Além disso, estudos sugerem uma ligação entre insultos fetais e alteração epigenética de genes resultando em modificações da expressão gênica (Bogdarina et al., 2007).

A metilação do promotor do gene *Igf1* foi maior em machos neonatos dos grupos HO e HO20 comparado aos grupos NR e HO10. Esta diferença na metilação entre os grupos redundou em menor expressão nos grupos HO e HO20. A ausência de diferença na concentração sérica de IGF-1 entre os grupos de neonatos é sugestiva de uma modulação transcripcional alterada. A correlação inversa entre a metilação do *Igf1* em machos neonatos de todos os grupos com o peso ao nascimento indica possivelmente que existe uma repercussão funcional decorrente da metilação deste gene. Estudos adicionais são necessários para elucidar esta constatação.

O conjunto de resultados de metilação e expressão gênica e de concentração sérica de insulina e de leptina permite um comentário semelhante ao feito com relação ao IGF-1. Aparentemente não há um vínculo funcional entre o conjunto de resultados mencionado.

Um aspecto que deve ser salientado com relação aos resultados de metilação gênica é o fato de que foram constatadas modificações no padrão com o envelhecimento da prole tanto em machos quanto em fêmeas. E mais uma vez o dimorfismo sexual está claro no estudo da metilação do DNA.

Ao contrário das mudanças genéticas, as marcas epigenéticas podem ser reversíveis como mostrado no presente estudo. Se as marcas epigenéticas adquiridas durante a programação fetal e através da herança germinativa, de fato, vir a ser reversível, então poderemos determinar quando, como e se o uso de métodos ou tratamentos preventivos, tais como dietas, medicamentos específicos ou mudanças de estilo de vida podem reverter as marcas epigenéticas adquiridas na vida fetal. Possíveis "dietas epigenéticas" favoráveis, sexo-específicas, podem ser investigadas como parte de prevenção e tratamento das alterações causadas nas proles.

6 CONCLUSÕES

a. As consequências do consumo de dieta com conteúdo reduzido de sódio durante a gestação sobre a prole dependem do momento em que a dieta é oferecida às mães. O baixo peso ao nascimento é decorrente do consumo de dieta hipossódica na segunda semana de gestação. A resistência à insulina na prole adulta é resultante do consumo de dieta hipossódica na primeira metade da gestação. A intolerância à glicose na prole adulta é um fenômeno que depende do consumo reduzido de sal durante toda a gestação.

b. Existe um dimorfismo sexual em uma parte substancial das consequências do consumo de dieta hipossódica durante a gestação sobre a prole.

c. O efeito de dieta hipossódica durante a gestação sobre a prole varia ao longo do seu envelhecimento.

d. O baixo peso ao nascimento em machos está, pelo menos em parte, relacionado com menores concentrações séricas de IGF-1, menor expressão gênica de *Igf1* e maior metilação do gene *Igf1*.

e. Os padrões de metilação dos genes avaliados não são constantes, variando com a idade.

7 ANEXOS

Tabela 1: Composição das dietas.

	Dietas	
Ingredientes	**NR**	**HO**
Caseína, proteína rica, g/kg de dieta	287,0	287,0
Sacarose, g/kg de dieta	313,4	313,4
Amido de milho, g/kg de dieta	200,0	200,0
Óleo de soja, g/kg de dieta	60,0	60,0
Celulose, g/kg de dieta	**86,6**	**97,9**
Mistura de vitaminas, g/kg de dieta	10,0	10,0
Mistura de minerais, g/kg de dieta	13,4	13,4
Etoxiquina (antioxidante), g/kg de dieta	0,012	0,012
Fosfato de cálcio dibásico ($CaHPO_4$), g/kg de dieta	13,4	13,4
Carbonato de cálcio ($CaCO_3$), g/kg de dieta	6,2	6,2
Cloreto de sódio (NaCl), g/kg de dieta	**10,0**	**1,72**

NR (dieta normossódica – 1,3% NaCl) e HO (dieta hipossódica – 0,15% NaCl) contêm o mesmo conteúdo de proteína 25%, carboidrato 49,8% e gordura 6,3% (% por peso) e 3,5 Kcal/g.

8 REFERÊNCIAS

Alarcón C, Serna J, Pérez-Villamil B, de Pablo F. Synthesis and differentially regulated processing of proinsulin in developing chick pancreas, liver and neuroretina. *FEBS Lett.* 1998; 436 (3): 361-6.

Alves-Rodrigues EN, Veras MM, Rosa KT, de Castro I, Furukawa LN, Oliveira IB, Souza RM, Heimann JC. Salt intake during pregnancy alters offspring's myocardial structure. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013; 23 (5): 481-6.

Antequera F, Bird A. Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90 (24): 11995-9.

Anway MD, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology*. 2006; 147 (6 Suppl): S43-9.

Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK. Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science.* 2005; 308 (5727): 1466-9.

Arenas-Huertero F, Recillas-Targa F. Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. *Gac Méd Méx.* 2006; 138 (6): 547-55.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell*. 1993; 75 (1): 73-82.

Barker DJP, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1986; 1 (8486): 1077-81.

Barker DJP, Winter P D, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet.* 1989; 2: 577-80.

Bauer MK, Harding JE, Basset NS, Breier BH, Oliver MH, Gallaher BH, Evans PC, Woodall SM, Gluckman PD. Fetal growth and placental function. *Mol Cell Endocrinol*. 1998; 140: 115-120.

Bédard S, Sicotte B, St-Louis J, Brochu M. Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a rat model of intra-uterine growth restriction. *J Physiol*. 2005; 562 (Pt3): 937-50.

Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002; 16 (1): 6-21.

Bird E, Contreras RJ. Maternal dietary NaCl intakes influences weanling rats salt preferences without affecting taste nerve responsiveness. *Dev Psychobiol.* 1987; 20 (2): 111-130.

Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ Res*. 2007; 100 (4): 520-6.

Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr*. 2007; 97 (6): 1036-46.

Burdge GC, Lillycrop KA, Jackson AA. Nutrition in early life, and risk of cancer and metabolic disease: alternative endings in an epigenetic tale? *Br J Nutr*. 2009; 101 (5): 619-30.

Campfield LA, Smith FJ. Overview. Neurobiology of OB protein (leptin). *Proc Nutr Soc*. 1998; 57: 429-40.

Carless M. Investigation of genomic methylation status using methylation-specific and bisulfite sequencing polymerase chain reaction. *Methods Mol Biol*. 2009; 523: 217-34.

Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, Katayama S, Shimokawa K, Ponjavic J, Semple CA, Taylor MS, Engström PG, Frith MC, Forrest AR, Alkema WB, Tan SL, Plessy C, Kodzius R, Ravasi T, Kasukawa T, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Kitazume Y, Kawaji H, Kai C, Nakamura M, Konno H, Nakano K, Mottagui-Tabar S, Arner P, Chesi A, Gustincich S, Persichetti F, Suzuki H, Grimmond SM, Wells CA, Orlando V, Wahlestedt C, Liu ET, Harbers M, Kawai J, Bajic VB, Hume DA, Hayashizaki Y. Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. *Nat Genet.* 2006; 38 (6): 626-35.

Chomczynski P, Sacchi N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162 (1): 156-159.

Cooney CA, Dave AA, Wolff GL. Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr*. 2002; 132 (8Suppl): 2393S-2400S.

Covic AM, Schelling JR, Constantiner M, Iyengar SK, Sedor JR. Serum C-peptide concentrations poorly phenotype type 2 diabetic end-stage renal disease patients. Kidney Int. 2000; 58 (4): 1742-50.

Cutfield WS, Hofman PL, Mitchell M, Morison IM. Could epigenetics play a role in the developmental origins of health and disease? *Pediatric Research* 2007; 61 (5): 68R-75R.

da Silva AA, de Noronha IL, de Oliveira IB, Malheiros DM, Heimann JC. Renin-angiotensin system function and blood pressure in adult rats after perinatal salt overload. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2003; 13 (3): 133-9.

De Boo HA, Harding JE. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2006; 46 (1): 4-14.

Desai M, Byrne CD, Meeran K, Martenz ND, Bloom SR, Hales CN. Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. *Am J Physiol*. 1997; 273 (4Pt1): G899-904.

Ding Y, Lv J, Mao C, Zhang H, Wang A, Zhu L, et al. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. *J Hypertens.* 2010; 28: 1290-7.

Dube S, Errazuriz I, Cobelli C, Basu R, Basu A. Assessment of insulin action on carbohydrate metabolism: physiological and non-physiological methods. *Diabet Med*. 2013; 30 (6): 664-70.

Duffield JA, Vuocolo T, Tellam R, Yuen BS, Muhlhausler BS, McMillen IC. Placental restriction of fetal growth decreases IGF1 and leptin mRNA expression in the perirenal adipose tissue of late gestation fetal sheep. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 294 (5): R1413-9.

Economides DL, Nicolaides KH, Campbell S. Metabolic and endocrine findings in appropriate and small for gestational age fetuses. *J Perinatal Med.* 1991; 19: 97-105.

Enzi G, ZanardoV, Caretta F, Inelmen EM, Rubaltelli F. Intrauterine growth and adipose tissue development. *Am J Clin Nutr.* 1981; 34: 1785-90.

Fisher DA. Fetal and neonatal endocrinology. In DeGroot LJ, Jameson JL, eds. Endocrinology, 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 2006; 3369-3386.

Forsdahl A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med.* 1977; 31: 91-5.

Fowden AL. The insulin-like growth factors and feto-placental growth. *Placenta*. 2003; (8-9): 803-12.

Ganguli, MC, Smith JD, Hanson LE. Sodium metabolism and its requirement during reproduction in female rats. *J Nutr*. 1969; 99: 225-34.

Gicquel C, Bouc Y**.** Hormonal regulation of fetal growth. *Horm Res.* 2006; 65 (3):28-33.

Giddings SJ, Carnaghi L. Rat insulin II gene expression by extraplacental membranes. A non-pancreatic source for fetal insulin. *J Biol Chem*. 1989; 264 (16): 9462-9.

Gluckman PD, Hanson MA, Morton SM, Pinal CS. Life-long echoes-a critical analysis of the developmental origins of adult disease model. *Biol Neonate*. 2005; 87 (2): 127-39.

Gluckman PD, Harding JE. Fetal growth retardation: underlying endocrine mechanisms and postnatal consequences. *Acta Paediatr Suppl*. 1997; 422:69-72.

Godfrey KM, Barker DJ. Fetal programming and adult health. *Public Health Nutr*. 2001; 4 (2B): 611-24.

Habener JF, Kemp DM, Thomas MK. Minireview: transcriptional regulation in pancreatic development. *Endocrinology*. 2005; 146 (3): 1025-34.

Hales CN, Barker DJ. The thrifty phenotype hypothesis. *Br Med Bull*. 2001; 60: 5-20.

Hauguel MS, Lepercq J, Catalano P. The known and unknown of leptin in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 2006; 194: 1537–1545.

Holman SR, Baxter RC. Insulin-like growth factor binding protein-3: factors affecting binary and ternary complex formation. *Growth Regul*. 1996; 6 (1): 42-7.

Holness MJ, Langdown ML, Sugden MC. Early-life programming of susceptibility to dysregulation of glucose metabolism and the development of Type 2 diabetes mellitus. *Biochem J*. 2000; 349 (Pt3): 657-65.

Holzenberger M, Hamard G, Zaoui R, Leneuve P, Ducos B, Beccavin C, Périn L, Le Bouc Y. Experimental IGF-I receptor deficiency generates a sexually dimorphic pattern of organ-specific growth deficits in mice, affecting fat tissue in particular. *Endocrinology*. 2001; 142(10):4469-78.

Huxley RR, Shiell AW, Law CM. The role of the size at birth and post natal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens* 2000; 18:815-831.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet*. 2003; 33 Suppl: 245-54.

Jimenez-Chillaron JC, Hernandez-Valencia M, Lightner A, Faucette RR, Reamer C, Przybyla R, Ruest S, Barry K, Otis JP, Patti ME. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. *Diabetologia*. 2006; 49 (8): 1974-84.

Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. *Nat Rev Genet*. 2007; 8 (4): 253-62.

Kermack WO, McKendrick AG, McKinlay PL. Death-rates in Great Britain and Sweden. Some general regularities and their significance. *Int J Epidemiol.* 2001; 30(4):678-83. Reprinted with kind permission of The Lancet. *Lancet* 1934; 31: 698-703.

Khan I, Dekou V, Hanson M, Poston L, Taylor P. Predictive adaptative responses to maternal high-fat diet prevent endothelial dysfunction but not hypertension in adult rat offspring. *Circulation*. 2004; 110: 1097-1102.

Kornberg RD. Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*. 1974; 24; 184 (4139): 868-71.

Kuroda A, Rauch TA, Todorov I, Ku HT, Al-Abdullah IH, Kandeel F, Mullen Y, Pfeifer GP, Ferreri K. Insulin gene expression is regulated by DNA methylation. *PLoS one.* 2009; 4 (9): e6953.

Langley-Evans SC. Critical differences between two low protein diet protocols in the programming of hypertension in the rat. *Int J Food Sci Nutr*. 2000; 51 (1): 11-7.

Leandro SM, Furukawa LN, Shimizu MH, Casarini DE, Seguro AC, Patriarca G, Coelho MS, Dolnikoff MS, Heimann JC. Low birth weight in response to salt restriction during pregnancy is not due to alterations in uterine-placental blood flow or the placental and peripheral renin-angiotensin system. *Physiol Behav*. 2008; 95 (1-2): 145-51.

Liang L, Guo WH, Esquiliano DR, Asai M, Rodriguez S, Giraud J, Kushner JA, White MF, Lopez MF. Insulin-like growth factor 2 and the insulin receptor, but not insulin, regulate fetal hepatic glycogen synthesis. *Endocrinology*. 2010; 151 (2): 741-7.

Lillycrop KA, Phillips ES, Jackson AA, Hanson MA, Burdge GC. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *J Nutr*. 2005; 135 (6): 1382-6.

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*. 1993; 75 (1): 59-72.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25 (4): 402-8.

Lopes KL, Furukawa LNS, Oliveira IB, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: A new pathway to programming adiposity indices in adult female Wistar rats. *Life Sciences.* 2008; 82: 728-32.

Maggio M, De Vita F, Lauretani F, Buttò V, Bondi G, Cattabiani C, Nouvenne A, Meschi T, Dall'Aglio E, Ceda GP. IGF-1, the cross road of the nutritional, inflammatory and hormonal pathways to frailty. *Nutrients*. 2013; 5 (10): 4184-205.

Mantzoros CS, Magkos F, Brinkoetter M, Sienkiewicz E, Dardeno TA, Kim SY, Hamnvik OP, Koniaris A. Leptin in human physiology and pathophysiology. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011; 301 (4): E567-84.

Margetic S, Gazzola C, Pegg CG, Hill RA. Leptin: a review of its peripheral actions and interactions. *Int Obes.* 2002; 26: 1407-33.

Margolis RN, Seminara D. Glycogen metabolism in late gestation in fetuses of maternal diabetic rats. *Biol Neonate*. 1988; 54 (3): 133-43.

Marques BG, Hausman DB, Latimer AM, Kras KM, Grossman BM, Martin RJ. Insulin-like growth factor I mediates high-fat diet-induced adipogenesis in Osborne-Mendel rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000; 278 (3): R654-62.

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985; 28 (7): 412-9.

McBride SM, Culver B, Flynn FW. Dietary sodium manipulation during critical periods in development sensitize adult offspring to amphetamines. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008; 295 (3): R899-905.

McKay JA, Adriaens ME, Ford D, Relton CL, Evelo CTA, Mathers JC. Bioinformatic interrogation of expression array data to identify nutritionally regulated genes potentially modulated by DNA methylation. *Genes Nutr*. 2008; 3: 167-71.

Milagro FI, Campión J, García-Díaz DF, Goyenechea E, Paternain L, Martínez JA. High fat diet-induced obesity modifies the methylation pattern of leptin promoter in rats. *J Physiol Biochem.* 2009; 65 (1): 1-10.

Milner RD, Hill DJ. Fetal growth control: the role of insulin and related peptides. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1984; 21 (4): 415-33.

Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E. Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet*. 1999; 23 (3): 314-8.

Morris TJ, Vickers M, Gluckman P, Gilmour S, Affara N. Transcriptional profiling of rats subjected to gestational undernourishment: implications for the developmental variations in metabolic traits. *PLoS one*. 2009; 4 (9): e7271.

Muhlhausler BS, Duffield JA, Ozanne SE, Pilgrim C, Turner N, Morrison JL, McMillen IC. The transition from fetal growth restriction to accelerated postnatal growth: a potential role for insulin signaling in skeletal muscle. *J Physiol*. 2009; 587 (Pt17): 4199-211.

Murakami-Kawaguchi S, Takasawa S, Onogawa T, Nata K, Itaya-Hironaka A, Sakuramoto-Tsuchida S, Yamauchi A, Ota H, Takeda M, Kato M, Okamoto H. Expression of Ins1 and Ins2 genes in mouse fetal liver. *Cell Tissue Res*. 2013 Nov 21.

Nuyt AM, Szyf M. Developmental programming through epigenetic changes. *Circ Res*. 2007; 100 (4): 452-5.

Oliver MH, Breier BH, Gluckman PD, Harding JE. Birth weight rather than maternal nutrition influences glucose tolerance, blood pressure, and IGF-I levels in sheep. *Pediatr Res*. 2002; 52 (4): 516-24.

Ozanne SE, Smith GD, Tikerpae J, Hales CN. Altered regulation of hepatic glucose output in the male offspring of protein-malnourished rat dams. *Am J Physiol*. 1996; 270 (4 Pt 1): E559-64.

Palmer JP, Fleming GA, Greenbaum CJ, Herold KC, Jansa LD, Kolb H, Lachin JM, Polonsky KS, Pozzilli P, Skyler JS, Steffes MW. C-peptide is the appropriate outcome measure for type 1 diabetes clinical trials to preserve beta-cell function: report of an ADA workshop, 21-22 October 2001. *Diabetes*. 2004; 53 (1): 250-64.

Priego T, Sánchez J, Palou A, Picó C. Effect of high-fat diet feeding on leptin receptor expression in white adipose tissue in rats: depot- and sex-related differential response. *Genes Nutr*. 2009; 4(2):151-6.

Pogribny I, Poirier LA, James SJ. Differential sensitivity to loss of cytosine methyl groups within the hepatic p53 gene of folate/ methyl deficient rats. *Carcinogenesis.* 1995; 16 (11): 2863-7.

Roberts CT, Owens JA, Sferruzzi-Perri AN. Distinct actions of insulin-like growth factors (IGFs) on placental development and fetal growth: lessons from mice and guinea pigs. *Placenta.* 2008; 29 (Suppl A): S42-7.

Rodacki M, Milech A, Oliveira JEP. A secreção residual do peptídeo-c faz diferença no tratamento do diabetes melito tipo 1? *Arq Bras Endocrinol Metab*. 2008; 52: 322-33.

Roy-Clavel E, Picard S, St-Louis J, Brochu M. Induction of intrauterine with a low-sodium diet fed to pregnant rats. *Am J obstet Gynecol.* 1999; 180: 608-13.

Santos F, Hendrich B, Reik W, Dean W. Dynamic reprogramming of DNA methylation in the early mouse embryo. *Dev Biol*. 2002; 241 (1): 172-82.

Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414 (6865): 799-806.

Sferruzzi-Perri AN, Owens JA, Pringle KG, Roberts CT. The neglected role of insulin-like growth factors in the maternal circulation regulating fetal growth. *J Physiol*. 2011; 1; 589 (Pt1): 7-20.

Stocker CJ, Arch JRS, Cawthorne MA. Fetal origins of insulin resistance and obesity. *Proc Nutr Soc.* 2005; 64: 143-51.

Vickers MH. Developmental programming and adult obesity: the role of leptin. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2007; 14: 17-22.

Vidonho JrAF, da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa L NS, Campos RR, Bergamaschi CMT, Carpinelli ÂR, Quintão ECR, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal salt restriction: A new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult Wistar rats. *Pedriatric Research*. 2004; 50: 842-848.

Villarroya F, Brun S, Giralt M, Cámara Y, Solanes G, Iglesias R. Gene expression of leptin and uncoupling proteins: molecular end-points of fetal development. B*iochem Soc Trans*. 2001; 29 (Pt2): 76-80.

Wadley GD, Siebel AL, Cooney GJ, McConell GK, Wlodek ME, Owens JA. Uteroplacental insufficiency and reducing litter size alters skeletal muscle mitochondrial biogenesis in a sex-specific manner in the adult rat. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008; 294 (5): E861-9.

Wadsworth ME, Cripps HA, Midwinter RE, Colley JR. Blood pressure in a national birth cohort at the age of 36 related to social and familial factors, smoking, and body mass. *Br Med J*. 1985; 291: 1534-8.

Waterland RA, Jirtle RL. Early nutrition, epigenetic changes at transposons and imprinted genes and enhanced susceptibility to adult chronic diseases. *Nutrition*. 2004; 20: 63-8.

Waterland RA, Travisano M, Tahiliani KG, Rached MT, Mirza S. Methyl donor supplementation prevents transgenerational amplification of obesity. *Int J Obes* (Lond). 2008; 32 (9): 1373-9.

Wentworth BM, Schaefer IM, Villa-Komaroff L, Chirgwin JM. Characterization of the two nonallelic genes encoding mouse preproinsulin. *J Mol Evol*. 1986; 23 (4): 305-12.

Wlodek ME, Mibus A, Tan A, Siebel AL, Owens JA, Moritz KM. Normal lactational environment restores nephron endowment and prevents hypertension after placental restriction in the rat. *J Am Soc Nephrol*. 2007; 18: 1688-96.

Zandi-Nejad K, Luyckx VA, Brenner BM. Adult Hypertension and kidney disease the role of fetal programming. *Hypertension*. 2006; 47 (2): 502-8.

APÊNDICE

-----Mensagem Original-----
From: The Journal of Nutrition Editorial Office
Sent: Thursday, February 06, 2014 12:24 PM
To: Joel Claudio Heimann
Subject: JN Acknowledgment of Manuscript

MS ID#: NUTRITION/2014/192179
MS TITLE: Low salt intake during pregnancy alters glucose metabolism and DNA methylation in the offspring
Joel Claudio Heimann

Dear Dr. Heimann:

Thank you for sending us the above manuscript which we have received at The Journal of Nutrition manuscripts receipt office. It has been forwarded to the Editor-in-Chief for assignment, on the understanding that it has not been submitted for publication to another journal and will not be submitted for publication elsewhere unless it is rejected.

If you have not already done so, please send any required permissions to reproduce previously published figures or tables, and a completed Manuscript Submission/Copyright Release Form (available at http://jn.nutrition.org/site/misc/mansub.pdf) to The Journal of Nutrition manuscripts receipt office. All authors must read and sign this form. The completed form can be sent to the American Society for Nutrition by fax (301-634-7892) or by uploading a scanned copy of the form using the "Upload Copyright Form" link available in all Author Area queues in the online submission system.

If this is an original research paper, and it was supported by NIH funding, please see the instructions at the following URL:
http://www.nutrition.org/publications/guidelines-and-policies/asn-policy-on-nih-repository.
Please visit http://submit.nutrition.org and login to your author area to follow the progress of your paper in the review process.

Thank you for choosing to submit your article to The Journal of Nutrition.

Yours sincerely,

Regina Pennington
The Journal of Nutrition Manuscripts Receipt Office

THE JOURNAL OF NUTRITION
Official Publication of the American Society for Nutrition

The Journal of Nutrition
NUTRITION/2014/192179
Version 1

Low salt intake during pregnancy alters glucose metabolism and DNA methylation in the offspring

Flávia Ramos Siqueira, Luzia Naôko Shinohara Furukawa, Ivone Braga Oliveira, and Joel Claudio Heimann

Instructions for Authors: http://jn.nutrition.org/site/misc/ifora.xhtml

Abstract

Maternal nutritional alterations during pregnancy are associated with metabolic disorders, and the period of pregnancy in which these alterations influence adult offspring remains uncertain. Epigenetic changes are proposed to underlie these disorders. Twelve-week-old female Wistar rats were fed a low-salt (LS) or normal-salt (NS) diet during gestation or LS during the first (LS10) or second (LS20) half of gestation. Maternal and offspring body weights were evaluated. Blood glucose, insulin (ITT) and glucose (GTT) tolerance tests, HOMA-IR, gene expression and DNA methylation were mapped in the male offspring. Weight gain was higher in NS and LS10 dams than in LS and LS20 dams in the third week of pregnancy. Birth weights were lower in LS20 and LS rats compared with NS and LS10 rats. HOMA-IR was higher in 12-week-old LS rats compared with NS rats and in 20-week-old LS10 rats compared with NS rats. Serum insulin were higher in 20-week-old LS10 rats compared with NS rats. The GTT indicated glucose intolerance only in 12- and 20-week-old LS rats. Methylation of the *Insr*, *Igf1*, *Igf1r*, *Ins1* and *Ins2* genes in liver in neonates and in liver, white adipose tissue and muscle in 20-week-old offspring were influenced by low-salt intake during pregnancy. In conclusion, low-salt diet in the second half of pregnancy can result in low birth weights in the offspring. Glucose intolerance observed in adult offspring occurred only if low salt intake was given throughout pregnancy. However, insulin resistance in response to low salt intake during pregnancy is related to the time at which this insult occurs and to the age of the offspring. Alterations in the DNA methylation of *Ifg1* were observed to be correlated with low birth weight in response to low salt feeding during pregnancy.