Neuziane Kloos Amorim Tavares

Avaliação das consequências da limitação do tamanho da prole de ratos Wistar ao nascimento sobre seu desenvolvimento ponderal e características morfofuncionais na idade adulta

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Nefrologia

Orientador**:** Prof. Dr. Joel Claudio Heimann

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Tavares, Neuziane Kloos Amorim
Avaliação das consequências da limitação do tamanho da prole de ratos Wistar ao nascimento sobre seu desenvolvimento ponderal e características morfofuncionais na idade adulta / Neuziane Kloos Amorim Tavares -- São Paulo, 2013.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Nefrologia.
Orientador: Joel Claudio Heimann.

Descritores: 1.Desenvolvimento fetal 2.Modelos animais 3.Peso corporal/fisiologia 4.Adiposidade 5.Obesidade/metabolismo 6.Resistência à insulina 7.Pressão arterial 8.Ratos Wistar

USP/FM/DBD-202/13

DEDICATÓRIA

À **Idair Kloos Tavares**,

minha querida mãe, modelo de perseverança e luta para a realização desse grande sonho, me ensinando que não importam as dificuldades, a desistência nunca deve ser uma opção.

AGRADECIMENTOS

Professor Doutor Joel Claudio Heimann,

Por me aceitar como sua aluna e me ensinar à importância da pesquisa científica. Pela paciência e dedicação incansável, pelo exemplo de competência e ética profissional, pela orientação impecável.

Doutora Luzia Naôko Shinohara Furukawa,

pela constante dedicação e amizade, me ensinando e ajudando em todos os experimentos, sem os quais não conseguiria realizar sozinha.

Msc. Ivone Braga de Oliveira,

pela grande força na realização deste trabalho, incentivo, companheirismo, amizade e apoio constante.

Fernanda de Jesus Aguiar e Cássia Oliveira,

Minhas queridas companheiras de trabalho, pela ajuda com os nossos queridos ratinhos.

Aos colegas que passaram pelo Laboratório de Hipertensão Experimental, durante o meu período de pós-graduação, com sua ajuda nos momentos difíceis.

Aos amigos Walter Campestre pela dedicação e apoio no cuidado dos animais e materiais utilizados neste trabalho.

À secretária Eliana Gonçalves e Pedro Henrique Gonçalves pela disponibilidade e constante ajuda.

À FAPESP pela concessão de bolsa de estudos durante todo o período de pós-graduação, o que facilitou minha dedicação à tese.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS
RESUMO
ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO 1

2 OBJETIVO 6

3 MÉTODOS 7

3.1 Protocolo experimental 7

3.2 Medidas do peso corpóreo 9

3.3 Medidas de pressão arterial caudal 10

3.4 Dosagens de glicose e insulina 10

3.5 Dosagens de colesterol e triacilgliceróis 11

3.6 Consumo de água e alimento 11

3.7 Medida da massa de tecido adiposo branco e marrom e da massa renal e cardíaca 11

3.7.1 Índice de adiposidade 11

3.8 Análises dos resultados 12

6 DISCUSSÃO 27

7 CONCLUSÃO 32

8 REFERÊNCIAS (*) 33

APÊNDICE

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Protocolo experimental grupo materno 8

Figura 2 - Protocolo experimental grupo prole 9

Figura 3 - Peso corpóreo materno 13

Figura 4 - Peso corpóreo materno durante a lactação 14

Figura 5 - Consumo de ração materno 15

Figura 6 - Consumo de água materno 15

Figura 7 - Pressão arterial caudal materno 16

Figura 8 - Evolução ponderal de ratos machos e fêmeas 17

Figura 9 - Pressão arterial caudal de ratos machos e fêmeas 18

Figura 10 - Glicemia e Insulinemia de ratos machos e fêmeas 19

Figura 11 - Glicemia, insulimenia e índice HOMA na 12ª semana de ratos machos e fêmeas 20

Figura 12 - Colesterol e Triacilgliceróis de ratos machos e fêmeas 21

Figura 13 - Massa do Rim Esquerdo de ratos machos e fêmeas 22

Figura 14 - Massa do Ventrículo Esquerdo de ratos machos e fêmeas 23

Figura 15 - Peso corpóreo, índice de adiposidade, consumo de ração e peso do tecido adiposo marrom na 12ª semana de ratos machos 24

Figura 16 - Peso corpóreo, índice de adiposidade, consumo de ração e peso do tecido adiposo marrom na 12ª semana de ratas fêmeas 25

Figura 17 - Ingestão hídrica e diurese de ratos machos e fêmeas 26

RESUMO

Tavares NKA. *Avaliação das consequências da limitação do tamanho da prole de ratos Wistar ao nascimento sobre seu desenvolvimento ponderal e características morfofuncionais na idade adulta* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP, Universidade de São Paulo; 2013.

Durante a vida intrauterina, o desenvolvimento do embrião e do feto é suscetível a mudanças ambientais que podem alterar o fenótipo do indivíduo na vida pós-natal. Eventos que ocorrem durante períodos críticos de rápida divisão celular, nos quais são formados os diversos órgãos e tecidos, podem alterar a estrutura e função de sistemas orgânicos gerando consequências precoces (baixo peso ao nascimento) e tardias (doenças na vida adulta). Os protocolos experimentais da maior parte dos estudos sobre a programação fetal reduz o tamanho da ninhada logo após o nascimento. Essa abordagem dificulta a interpretação e reprodutibilidade dos resultados observados. O objetivo deste estudo foi determinar se a pressão sanguínea, o metabolismo de carboidratos e gasto energético em proles adultas é influenciado pelo tamanho da ninhada. Ratas Wistar foram alimentadas com ração padrão *ad libitum* e foram acasaladas com ratos machos com 12 semanas de idade. Após o nascimento, a prole foi dividida em três grupos: tamanho da ninhada sem redução (Gc), proles reduzido a oito filhotes (G8) e proles reduzidos a quatro filhotes (G4). Ao fim de 12 semanas de idade, o peso corporal, pressão arterial, consumo de ração, glicemia, insulina, colesterol e triacilgliceróis, massa de tecido adiposo marrom, índice de adiposidade, massa renal e cardíaca foram determinados. O peso corporal, índice de adiposidade, glicemia, nível de insulina e índice HOMA foram maiores em machos e fêmeas no grupo G4 do que nos grupos G8 e Gc. No entanto, o consumo de ração foi menor no grupo G4. A pressão arterial foi maior no grupo Gc em machos e fêmeas. Em resumo, a redução do tamanho da ninhada está relacionada com a obesidade, resistência à insulina e possíveis alterações no gasto energético na prole adulta.

Descritores: Desenvolvimento fetal; Modelos animais; Peso corporal/fisiologia; Adiposidade; Obesidade/metabolismo; Resistência à insulina; Pressão arterial; Ratos Wistar

ABSTRACT

Tavares NKA. *Evaluation of the consequences of limiting the litter size of rats on their birth about weight development and morphofunctional characteristics in adulthood* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP, Universidade de São Paulo; 2013.

During intrauterine life, the developing fetus is susceptible to environmental changes that can alter the phenotype of the individual in postnatal life. This phenomenon is called fetal programming. Events that occur during critical periods of rapid cell division may alter the structure and function of organ systems, resulting in consequences both early (low birth weight) and late (diseases in adulthood) in life. The experimental protocols of most of the studies on fetal programming involve a reduction in litter size soon after birth. This approach hampers the interpretation and reproducibility of the observed results. The purpose of this investigation was to determine if blood pressure, carbohydrate metabolism and energy expenditure in adult offspring are influenced by litter size. Female Wistar rats were fed standard rat chow *ad libitum* and were mated with male rats at 12 weeks of age. After birth, the offspring were divided into three groups: unchanged litter size (GU), culled to eight neonates (G8) and culled to four neonates (G4). At 12 weeks of age, the body weight; blood pressure; food intake; glucose, insulin, cholesterol and triacylglycerol levels; brown adipose tissue mass; adiposity index; renal mass; and cardiac mass were determined. The body weight, adiposity index, glucose level, insulin level and HOMA index were higher in males and females in the G4 group than in the G8 and GU groups. However, food consumption was lower in G4 males. The blood pressure was higher in the GU group. In summary, a small litter size is related to obesity, possible alterations in energy expenditure and insulin resistance in adult offspring.

Descriptors: Fetal develpment; Models, animal; Body weight/physiology; Adiposity; Obesity/metabolism; Insulin resistance; Arterial pressure; Rats, Wistar

1 INTRODUÇÃO

Durante a vida intrauterina, o desenvolvimento do embrião e do feto é suscetível a mudanças ambientais. O efeito da exposição às condições adversas no período perinatal pode modificar o fenótipo do indivíduo na vida pós-natal, tanto precocemente quanto tardiamente. Isto é conhecido como "hipótese de Barker". Estes autores mostraram que o baixo peso da criança ao nascimento está associado com maior morbimortalidade cardiovascular na vida adulta. De acordo com estes autores, o desenvolvimento do feto apresenta determinados períodos críticos de rápida divisão celular, nos quais são formados os diversos órgãos e tecidos. Eventos ocorridos durante estes períodos podem alterar a estrutura e função de sistemas orgânicos gerando consequências precoces (baixo peso ao nascimento) e/ou tardias (doenças na vida adulta) [1, 2, 3, 4, 5].

Doenças crônicas como diabetes do tipo II e hipertensão arterial foram relacionadas com eventos que acontecem no ambiente perinatal pela primeira vez por Barker e colaboradores na década de 1980. Estes autores, em um estudo epidemiológico, mostraram uma relação inversa entre baixo padrão socioeconômico, mortalidade infantil e doença cardíaca isquêmica na vida adulta. Assim, os autores sugerem que uma nutrição inadequada em fases precoces do desenvolvimento poderia ser a causa deste fenômeno [1].

Ao lado da subnutrição durante a gravidez, o crescimento fetal pode ser prejudicado devido à redução na entrega de nutrientes e suprimento de oxigênio da mãe através da placenta. A baixa perfusão placentária e/ou redução na função placentária são as principais causas de transporte reduzido de nutrientes e oxigênio da mãe para o feto [6, 7, 8, 9].

O estudo em seres humanos de adaptações que ocorrem devido à programação fetal é limitado devido a questões éticas. Sendo assim, vários modelos animais têm sido desenvolvidos. Foram desenvolvidos modelos de estudo com diferentes conteúdos de proteína na dieta que a mãe recebe durante a gestação (baixo ou alto conteúdo de proteína)[10] ou restrição

calórica [11, 12], insuficiência uteroplacentária[13, 14, 15], baixa ou alta ingestão de sal [16 - 23]. Em todos esses modelos animais é necessária uma padronização do protocolo experimental para facilitar a interpretação e a reprodutibilidade dos resultados obtidos. As características do tempo e da intensidade das condições adversas no período perinatal e pós-natal precoces precisam ser normalizados, a fim de permitir a comparação dos resultados obtidos nos diferentes estudos realizados para compreender melhor a programação fetal. O tamanho da prole é uma das características que varia entre os estudos sobre programação fetal.

A maioria dos estudos realizados neste [16-21] e em outros laboratórios [11, 15, 24-39] para avaliar os efeitos de alterações no ambiente perinatal sobre a prole ao nascimento e na idade adulta limita o tamanho da prole logo após o nascimento sem informar o motivo deste procedimento.

Para confirmar esta informação, uma pesquisa bibliográfica foi realizada na base PubMed, utilizando como critérios de busca as palavras *"perinatal, rats, insulin resistance".* O termo *"insulin resistance"* foi utilizado porque a constatação deste fenômeno em prole adulta é um dos objetivos do presente estudo. O resultado da pesquisa bibliográfica revelou estudos nos quais a maioria limitou o tamanho da prole logo após o nascimento. Geralmente a limitação foi em quatro machos e quatro fêmeas.

Em 2009 quando esse projeto foi planejado foram encontrados vinte oito artigos dos quais foi possível acessar o texto completo de vinte e um. Destes vinte e um, quinze [11, 19-21, 29-39] informaram nos métodos que limitam o tamanho da prole sem a devida justificativa para tal procedimento ou informações sobre os critérios utilizados. Apenas em um estudo o autor justificou a opção pela limitação do tamanho da prole [32]. Realizada a pesquisa novamente em 2012 foram encontrados trinta e seis artigos com a mesma estratégia de busca em 2009. Foi possível acessar o texto completo de vinte sete. Em vinte um [11, 15, 19-21, 24-39] informaram nos métodos que limitam o tamanho da prole. A maioria desses autores também não informa o motivo da limitação do tamanho da prole. Porém, alguns deles fazem pequenos comentários sobre essa escolha.

Neitzke e colaboradores [15] utilizam a limitação do tamanho da prole como modelo de estudo do papel da nutrição neonatal onde proles reduzidas a três filhotes são consideradas superalimentadas e são comparadas aos grupos de proles intactas.

Oliveira e colaboradores [27] explicam que para evitar a influência do tamanho da ninhada no efeito da programação fetal são mantidos dez filhotes por ninhada. Ainda informam que as proles foram ajustadas apenas com filhotes do sexo masculino. Para assegurar que cada filhote receberia nutrição comparável Oliver Chen et al. reduziram o tamanho da prole para oito a dez filhotes [28]. Boullu-Ciocca e colaboradores também justificam a limitação da prole como forma de estudo de programação fetal com ratos superalimentados através da redução da prole a três filhotes [31].

Plagemann e colaboradores consideram que ratos criados em pequenas ninhadas é um modelo adequado para o estudo das consequências da superalimentação/supernutrição precoce pós-natal [32, 37, 38]. Estes autores ainda informa que esses ratos rapidamente desenvolvem obesidade. Ao contrário, ratos desnutridos devido à criação em grandes ninhadas desenvolvem baixo peso até o desmame [40-42]. Comparando os resultados da pesquisa bibliográfica inicial com a atual, é possível observar que houve um aumento percentual de publicações nas quais os autores justificam a redução do tamanho da prole. Comprovando assim a preocupação dos autores com relação à importância da padronização do protocolo experimental. Porém, essas informações ainda são muito restritas.

A subnutrição (grandes ninhadas) e supernutrição (pequenas ninhadas) durante o período pós-natal alteram permanentemente o fenótipo adulto de maneira específica. A supernutrição (pequenas ninhadas) altera a sinalização da insulina o que induz a uma resistência à insulina [42, 43].

Waterland et al. [44] estudaram os efeitos persistentes do tamanho da prole no período de amamentação. Filhotes de pequenas ninhadas foram supernutridos durante o período do aleitamento e aqueles de grandes ninhadas receberam baixa nutrição. Apesar de todos os ratos obterem livre acesso a mesma dieta após o desmame, no período de aleitamento o

tamanho das ninhadas influencia a composição corpórea [44, 45], metabolismo do colesterol [46] e o metabolismo da insulina [44, 45, 46] quando adultos. Ratos criados em pequenas ninhadas desenvolvem maior peso corpóreo ainda no período do aleitamento [44 45].

Estudos nos quais foi reduzido o tamanho da ninhada com peso normal ao nascimento, ou seja, sem a restrição uteroplacentária de nutrientes, revelaram resultados conflitantes. Para O´Dowd e colaboradores [13] o tamanho da ninhada e do estímulo de sucção afetam diretamente a qualidade e quantidade de leite produzida durante a lactação. Ratos que foram criados em pequenas ninhadas tiveram seu desenvolvimento comprometido com um desenvolvimento ponderal retardado durante a amamentação [13 14]. Os ratos do citado estudo ainda apresentaram menor consumo de leite nos dias 7 e 14 e menor concentração de lactose no leite, que podem ter contribuído para o seu crescimento retardado. O menor consumo de leite para a prole reduzida poderia ser causado por uma redução do estímulo de sucção devido ao número reduzido de filhotes, o que pode atrasar a produção do leite [13].

A falta de justificativa para a limitação do tamanho da prole ao nascimento levanta algumas questões sobre essa prática. A limitação do tamanho da prole pode introduzir um vício que compromete a qualidade do estudo. Os critérios de seleção dos indivíduos que serão eliminados para limitar o tamanho da prole podem induzir um vício de amostragem, o que precisa ser considerado no planejamento dos estudos.

Devido à ausência de justificativa para utilização de proles de tamanho limitado, o objetivo do presente estudo é entender melhor as consequências da limitação ou não do tamanho da prole sobre o seu desenvolvimento ponderal e o aparecimento de alterações estruturais na idade adulta. Para este propósito foram comparadas proles de tamanho limitado com oito animais, proles de tamanho limitado com quatro animais e proles sem tamanho limitado. Foi avaliado o peso corpóreo, glicemia, insulinemia, índice HOMA, colesterol, triacilgliceróis, pressão arterial caudal,

consumo de água e alimento, massa do tecido adiposo branco e marrom, massa renal e cardíaca nestes três grupos.

2 OBJETIVO

Avaliar as consequências da limitação ou não do tamanho da prole sobre o desenvolvimento ponderal e alterações estruturais e no metabolismo de carboidratos e de lípides.

3 MÉTODOS

Os experimentos realizados neste projeto de pesquisa estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal adotado pelo Código Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pela Comissão de Ética para Análises de Projetos de Pesquisa – CAPPesq do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com nº protocolo: 0978/09

3.1 Protocolo experimental

Grupo Materno

Foram utilizados fêmeas e machos da espécie *Ratus norvergicus*, linhagem Wistar, oriundos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com oito semanas de idade. Ratas fêmeas foram acondicionadas em gaiolas ventiladas, em local climatizado a 22ºC com ciclos alternados de doze horas de claro e escuro, recebendo água e dieta normossódica (NR – 1,3% de NaCl e 25% de proteína) (Harlan -Teklad – USA) *ad libitum* a partir da oitava semana de vida.

Ao completarem doze semanas de vida, as fêmeas foram acasaladas. Para o acasalamento, duas fêmeas e um macho permaneceram juntos durante três dias. As ratas foram pesadas semanalmente desde a oitava semana até o desmame da prole. A medida da pressão arterial caudal (PAc) foi realizada semanalmente a partir da 11ª semana de idade até o final da gestação. A mensuração do consumo de alimento e água foi feita no período gestacional.

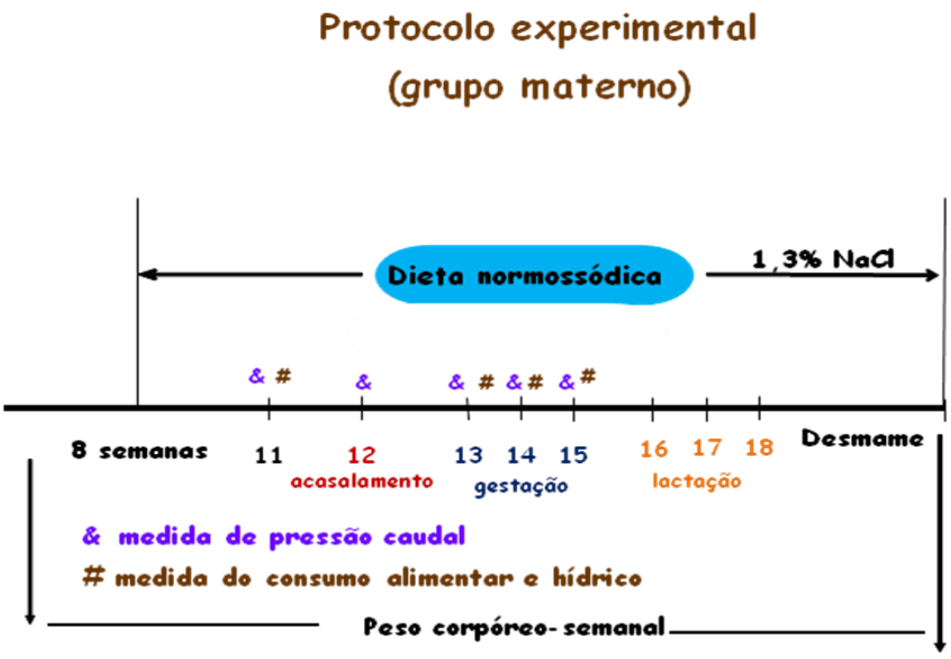


Figura 1 - Protocolo experimental grupo materno

Grupo Prole

No dia do nascimento, o tamanho da prole, o peso dos recém-nascidos e o número de natimortos foram avaliados. As proles foram divididas em três grupos experimentais: grupo completo (Gc), sem limitação do tamanho da prole, grupo reduzido (G8), com limitação da prole em quatro machos e quatro fêmeas e grupo reduzido 2 (G4), com limitação da prole em dois machos e duas fêmeas.

A seleção dos recém-nascidos que permaneceram com as mães ou foram sacrificados foi realizada de maneira que os pesos de ambos os grupos fossem comparáveis.

Os recém-nascidos excedentes foram sacrificados por decapitação nas primeiras vinte e quatro horas de vida para coleta de sangue. O sangue foi coletado em tubos de plástico, centrifugado por 10 minutos a 3.000 rpm e o soro foi armazenado a -20 ºC para posterior análise. As proles foram desmamadas com três semanas de vida e. Depois do desmame as proles foram alimentadas com dieta normossódica (Nuvital CR-1, Colombo, PR Brasil).

A medida de peso corpóreo foi realizada semanalmente desde o nascimento até a 12ª semana de idade. A medida da pressão arterial caudal foi realizada a cada duas semanas da 6ª até a 12ª semana de idade. Na 12ª semana de idade o consumo alimentar e hídrico foi medido, sangue caudal foi coletado para medida de glicemia e posterior dosagem de insulina, colesterol e triacilgliceróis. Ao final do protocolo os ratos foram decapitados e os tecidos armazenados para posterior estudo.

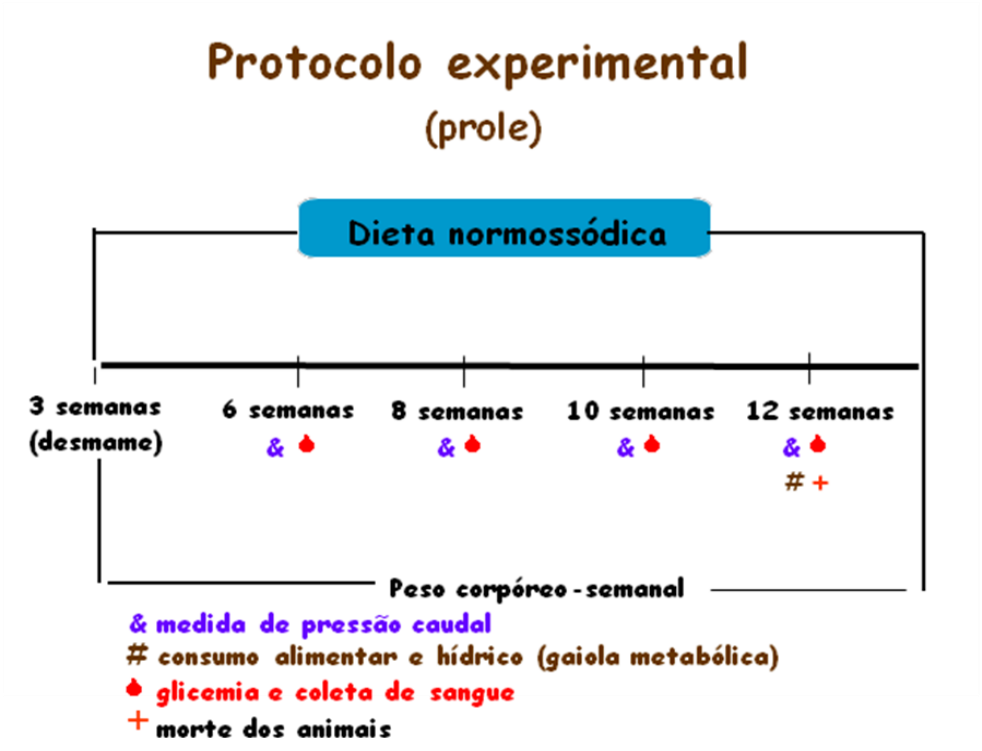


Figura 2 - Protocolo experimental grupo prole

3.2 Medidas do peso corpóreo

A medida do peso corpóreo foi realizada por meio de balança digital específica para pesagem de animais (modelo AS500, Marte Balança, São Paulo, Brasil).

O peso corpóreo das mães foi aferido semanalmente da 8ª semana até a 18ª semana de idade (desmame da prole).

O peso corpóreo da prole foi aferido semanalmente do nascimento à 12ª semana de idade.

3.3 Medidas de pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal (PAc) foi medida pelo sistema de medida de pressão caudal (RTBP 2045 – com um sistema de aquisição de dados RTBP 001 - Kent Scientific Corporation; Connecticut, USA). As medidas foram realizadas com os animais acordados e foram consideradas apenas aquelas obtidas em condição de ausência de movimentação do animal. No dia do experimento os ratos foram aquecidos por 30 minutos antes das medidas de PAc. Para cada animal foram registradas entre 3 ou 4 medidas de PAc e calculada a média dessas medidas.

A PAc das mães foi medida semanalmente, a partir da 11ª semana de idade até o final da gestação.

A PAc da prole foi avaliada a cada duas semanas, a partir da 6ª semana até a 12ª semana de idade.

3.4 Dosagens de glicose e insulina

A coleta de sangue foi feita na veia caudal na 8ª, 10ª e 12ª semanas de idade após jejum de 12 horas. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado para separação do soro. O soro foi estocado a –20ºC até o momento da dosagem da insulina.

A glicose foi medida na 8ª, 10ª e 12ª semanas de idade após jejum noturno e foi determinada por meio de tiras reativas (Advantage, Roche Diagnostics Corporation) analisadas em glicosímetro (marca Advantage, Eli Lily, Boehringer Mannheim), com limite de detecção entre 10 e 600 mg/dL.

A dosagem da insulina foi realizada pelo método de radioimunoensaio. Foi utilizado o kit da marca LINCO (Rat Insulin Kit, LINCO Research Inc. – St. Charles, MO - USA) (Licença CNEN AP-0889 e Mat: 13094). O índice HOMA foi calculado pela fórmula seguinte:

Índice HOMA = glicemia (mmols.L^{-1}).insulina (µU.L^{-1})/22.5^{-1}

3.5 Dosagens de colesterol e triacilgliceróis

A coleta de sangue também foi feita por punção da veia caudal na 12ª semana de idade após um jejum de 12 horas. O sangue coletado foi imediatamente centrifugado para separação do soro e estocado a -20°C até o momento da dosagem.

As dosagens de colesterol e triacilgliceróis foram realizadas pelo método enzimático, sendo utilizados “kits” da marca Labtest (Cholesterol Liquiform e Triglycerides Liquiform Labtest Minas Gerais, Brasil).

3.6 Consumo alimentar e hídrico.

Para esta avaliação, na 12ª semana de idade os animais foram alocados em gaiolas metabólicas individuais (modelo-650-0100, Nalgene Branch Products – Rochester, NY) durante três dias, sendo os dois primeiros para adaptação ao novo ambiente. Após este período foi medido o consumo alimentar e hídrico.

3.7 Medida da massa de tecido adiposo branco, marrom e da massa renal e cardíaca

Os animais foram sacrificados na 12ª semana de idade por decapitação. Em seguida, o rim, coração (ventrículo esquerdo), tecido adiposo marrom (BAT – brown adipose tissue),branco inguinal, retroperitoneal, gonadal e mesentérico foram dissecados, colocados em placas de Petri secas, pesados em balança analítica e armazenados a -80ºC. A massa corpórea foi utilizada para calcular o índice de adiposidade, utilizado como indicador de obesidade.

3.7.1 Índice de adiposidade

O índice de adiposidade foi calculado com a seguinte fórmula: Índice de adiposidade (%) = (soma da massa dos tecidos adiposos (g) /massa corpórea (g)) X 100. Os tecidos adiposos utilizados para soma foram o tecido adiposo gonadal, inguinal, mesentérico e retroperitoneal.

3.8 Análises dos resultados

Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média (SEM). As médias dos diversos grupos foram comparadas por meio de análise de variância de um ou dois fatores (one-way ou two-way ANOVA), quando pertinente, seguido de pós-teste de Tukey (one-way) e Bonferroni, Newman-Keuls ou Fisher (two-way). O cálculo da inclinação da curva da evolução longitudinal do peso corpóreo e PAc do grupo materno foi realizado por meio de regressão linear. Erro α menor do que 5% foi estabelecido para aceitar diferenças como sendo significantes ($p<0,05$).

4 RESULTADOS

Grupo Materno

O incremento do peso corpóreo foi maior durante a gestação (12ª a 15ª semana) comparado ao período pré-gestacional (figura 3).

A área sob a curva do aumento do peso corpóreo foi maior ($p<0,05$) durante a gestação comparada ao período anterior, indicando que o período de gestação acelera o ganho de peso corporal (Antes da gestação = 91,6 ± 14,4; n = 8 - durante a gestação = 144 ± 14,5; n = 11 g/semanas).

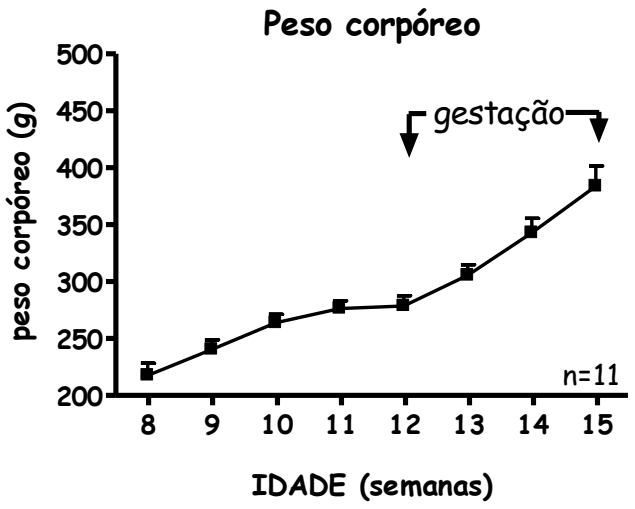


Figura 3 - Peso corpóreo de ratas Wistar antes e durante a gestação.

Após o nascimento, as proles foram divididas em grupos conforme a limitação ou não do seu tamanho. As proles cujo tamanho não foi reduzido foram denominados grupos completos (Gc), proles cujo tamanho foi reduzido a oito filhotes (quatro machos e quatro fêmeas) foram denominadas grupo oito (G8) e proles que foram reduzidos a quatro filhotes (dois machos e duas fêmeas) foram denominadas grupo quatro (G4).

O peso (g) corpóreo das mães medido durante a lactação (15ª a 18ª semana) não foi diferente entre os grupos estudados (figura 4).

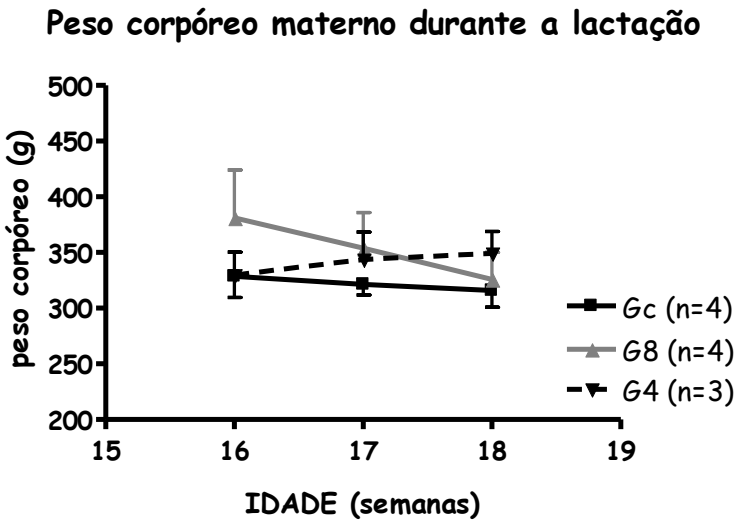


Figura 4 - Peso corpóreo de mães durante a lactação nos grupos completo (Gc), reduzido a oito (G8) e reduzido a quatro (G4).

Consumo de ração

O aumento do consumo observado a partir da 13ª semana deve-se ao período gestacional (figura 5).

Durante a gestação, o consumo de ração foi maior ($p<0,05$) na primeira e na terceira semana, em comparação com a semana anterior a gestação (figura 5). Na 12ª semana não há medida de consumo devido à presença de rato macho para o acasalamento.

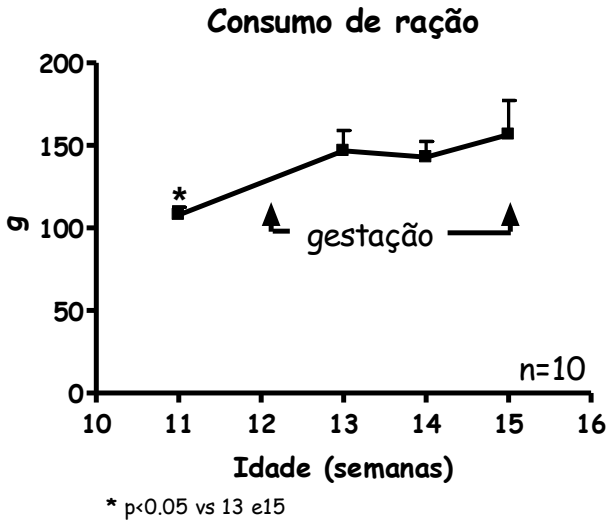


Figura 5 - Consumo de ração de ratas Wistar antes e durante a gestação.

Consumo de água

O consumo de água foi maior durante a gestação comparado ao período antes da gestação (figura 6).

Durante a gestação, o consumo de água foi maior ($p<0,05$) na segunda semana, em comparação com a semana anterior a gestação (figura 5). Na 12ª semana não há medida de consumo devido à presença de rato macho para o acasalamento.

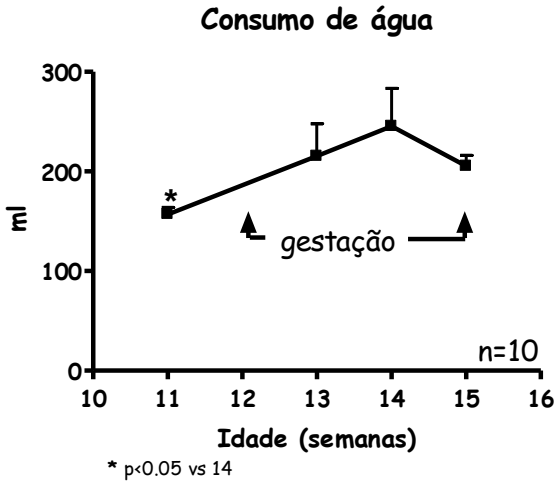


Figura 6 - Consumo de água de ratas Wistar antes e durante a gestação.

Pressão arterial caudal

Não há variação na pressão arterial caudal observada ao longo da gestação (figura 7).

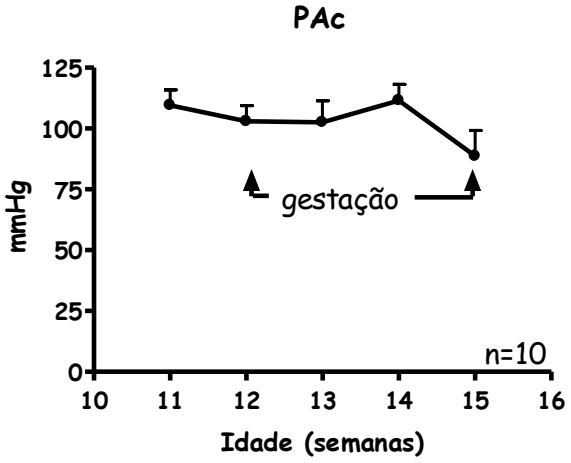


Figura 7 - Pressão arterial caudal de ratas Wistar antes e durante a gestação.

Grupo Prole

As proles foram identificadas segundo o seu tamanho (completa, reduzida 8 ou reduzida 4) com as seguintes siglas: Gc para grupo completo, G8 para grupo reduzido a oito filhotes e G4 para grupo reduzido a quatro filhotes.

Peso corpóreo

O peso (g) corpóreo do grupo G4 foi maior ($p<0,05$) comparado ao grupo Gc a partir da 4ª semana até a idade adulta (11ª semana) em machos, e nas fêmeas a partir da 3ª semana até a 10ª semana (figura 8). O peso corpóreo do grupo G4 foi maior ($p<0,05$) do que o peso corpóreo do grupo G8, a partir da 7ª semana nos machos e a partir da 2ª semana em fêmeas até a idade adulta (11ª semana) em machos e fêmeas (figura 8).

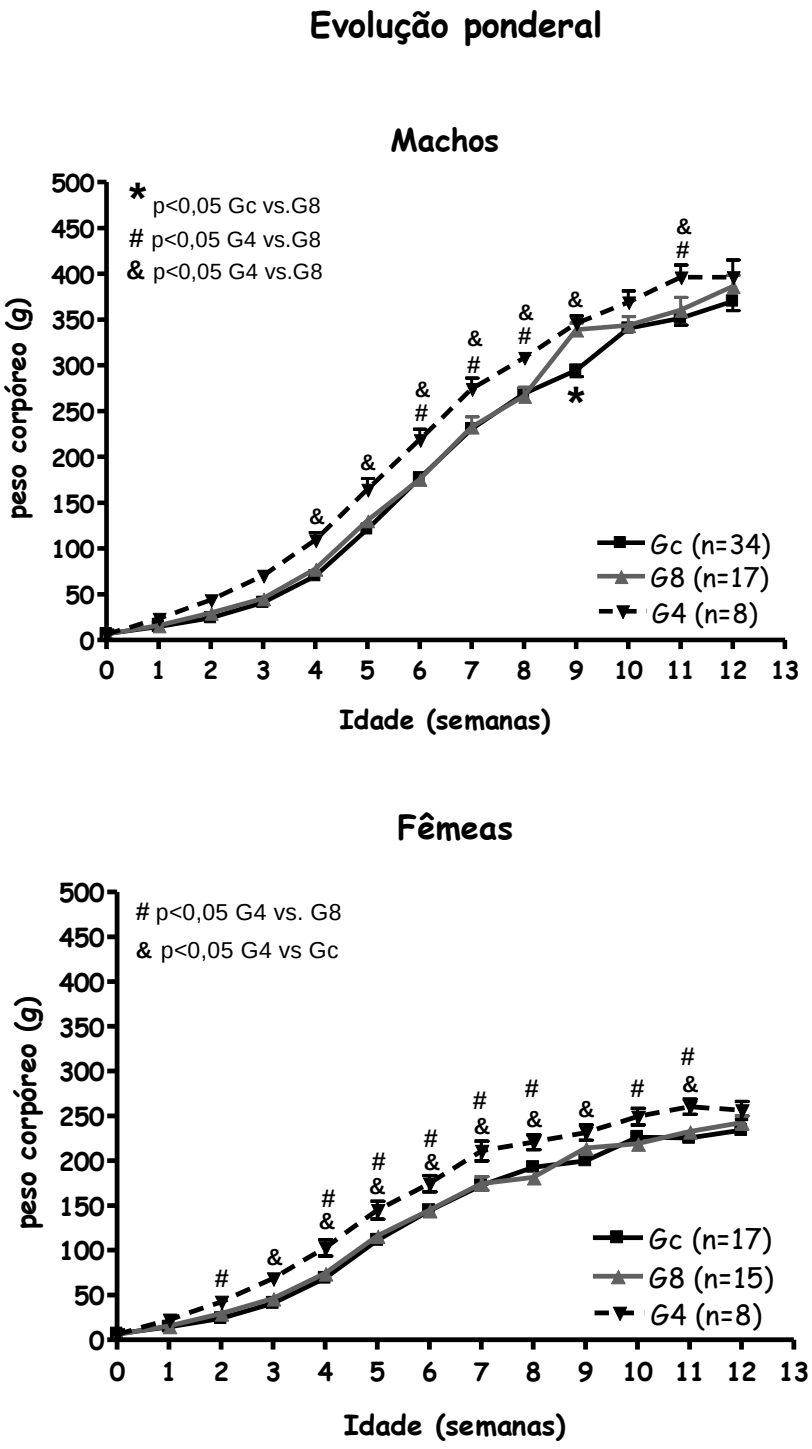


Figura 8 - Evolução ponderal de ratos Wistar machos e fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4) medido semanalmente da semana zero até a 12ª semana de vida.

Pressão arterial caudal

A pressão arterial caudal (PAc) foi maior (p<0,05) no grupo Gc em machos na 10ª semana comparado ao grupo G8. Nos machos e fêmeas de 12 semanas de idade a pressão arterial do grupo Gc foi superior (p<0,05) a pressão arterial do grupo G8 (figura 9).

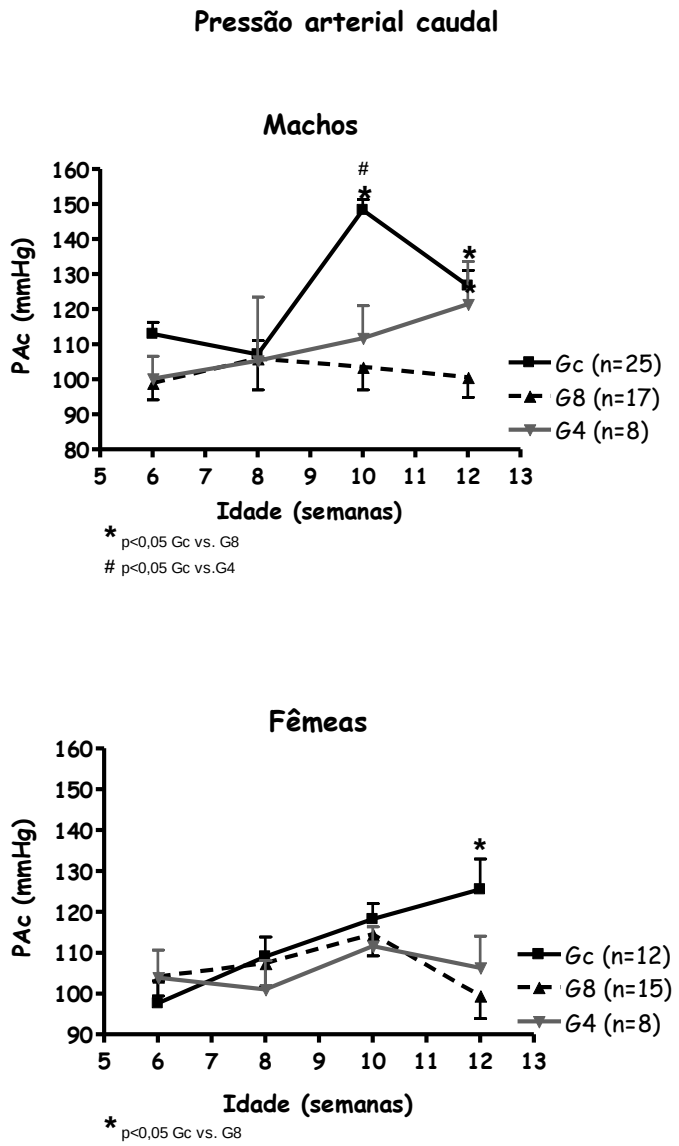


Figura 9 - Pressão arterial caudal de ratos Wistar machos e fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4) medido na 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de vida.

Glicemia e Insulinemia

A glicemia foi maior (p<0,05) no grupo G4 comparado a glicemia do grupo G8 a partir da 8ª semana até a 12ª semana de idade (machos e fêmeas). O grupo G4 teve maior glicemia que o Gc na 10ª semana apenas em machos (figura 10). A insulinemia foi maior (p<0,05) no grupo G4 em machos e fêmeas da 8ª semana a 12ª semana de idade comparada ao Gc e G8 (figura 10).

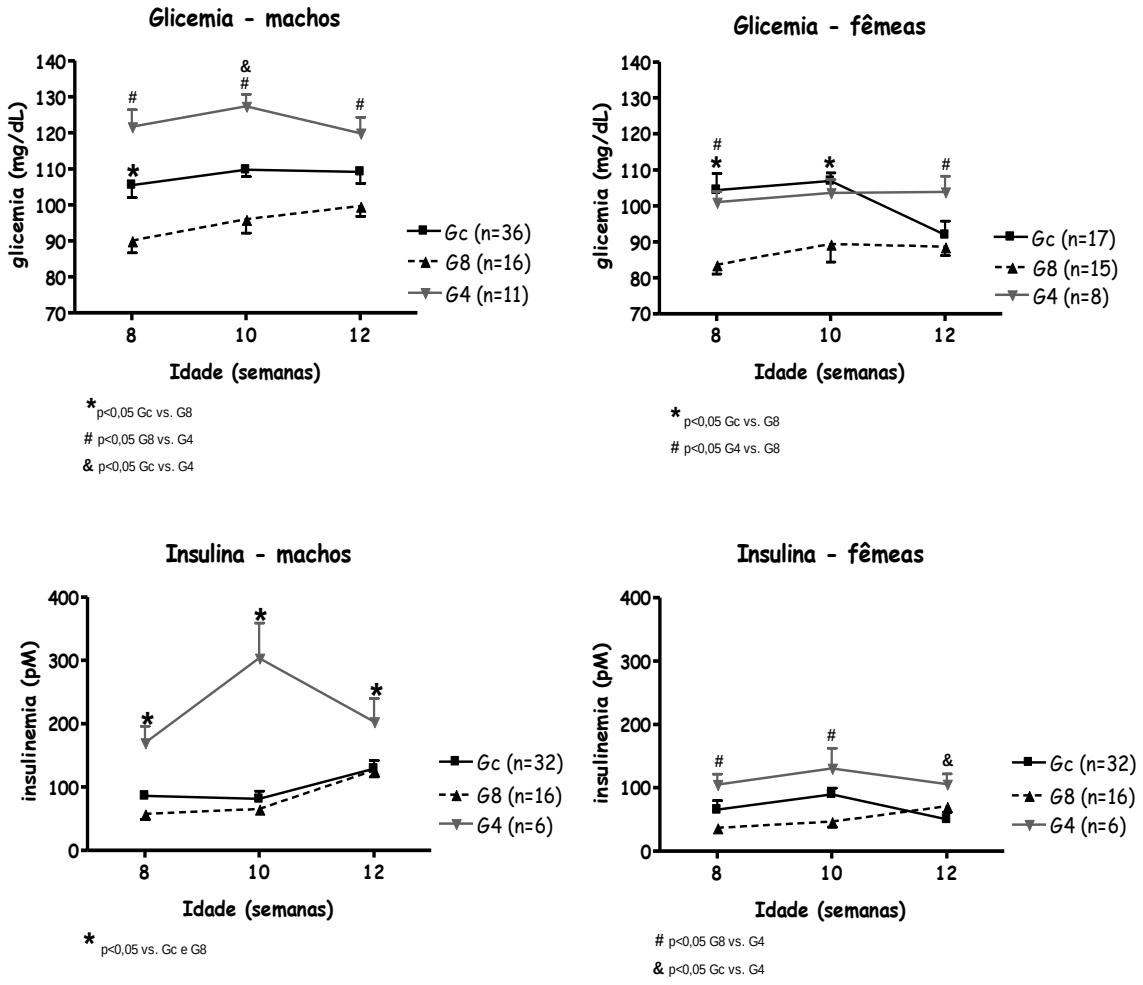


Figura 10 – Glicemia e Insulinemia de ratos Wistar machos e fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4) medido na 6ª, 8ª, 10ª e 12ª semana de idade.

A glicemia, insulinemia e índice HOMA foram maiores (p<0,05) no grupo G4 na 12ª semana de idade em machos e fêmeas (figura 11).

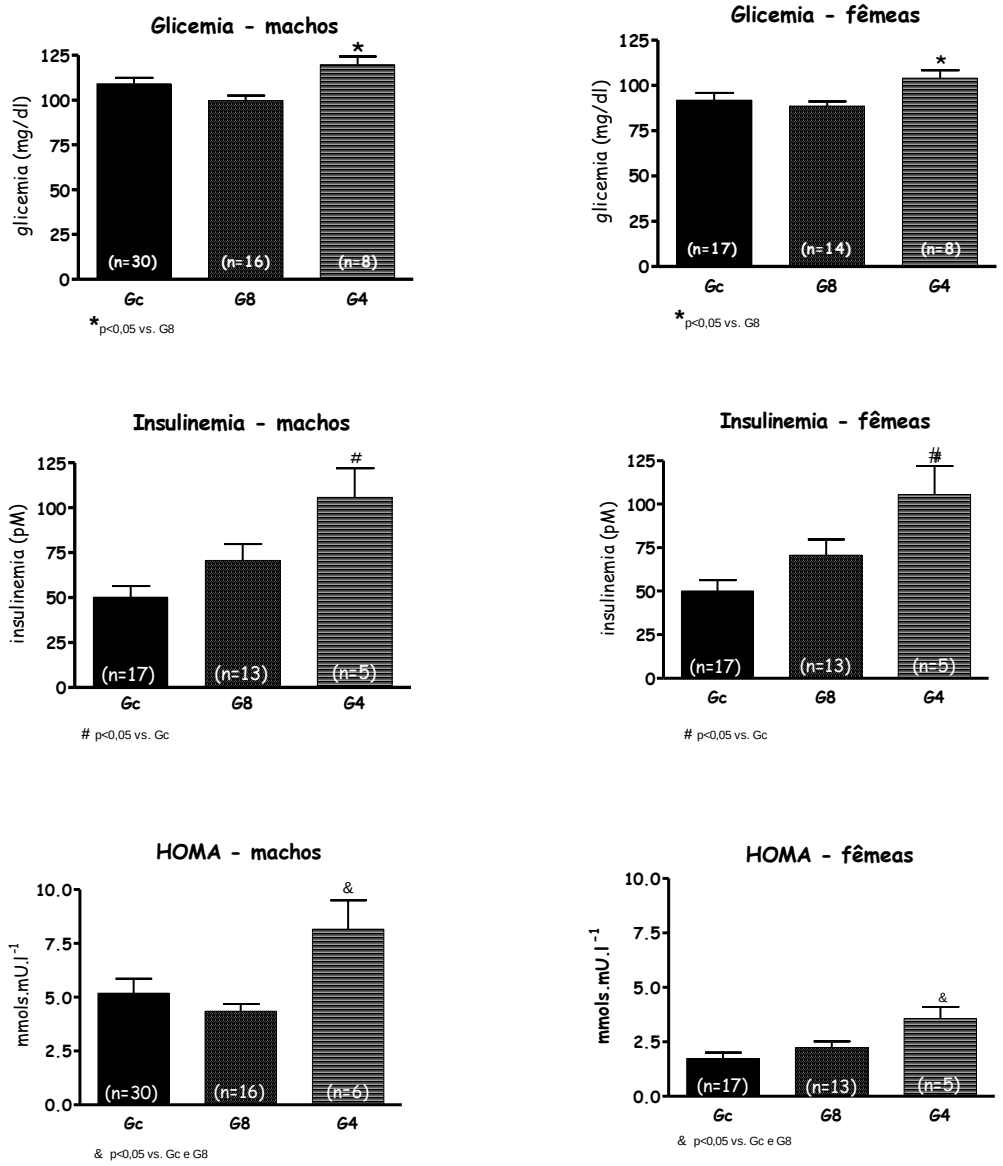


Figura 11 – Glicemia, insulinemia e índice HOMA de ratos Wistar machos e fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4) medido na 12ª semana de idade.

Colesterol e triacilgliceróis

O colesterol foi maior ($p<0,05$) no grupo Gc na 12ª semana de idade em machos comparado ao colesterol do grupo G8 e não houve diferença entre os grupos nas fêmeas (figura 11). O triacilglicerol foi menor ($p<0,05$) no Gc na 12ª semana em machos comparado aos triacilgliceróis do G8 e não houve diferença entre os grupos nas fêmeas (figura 12).

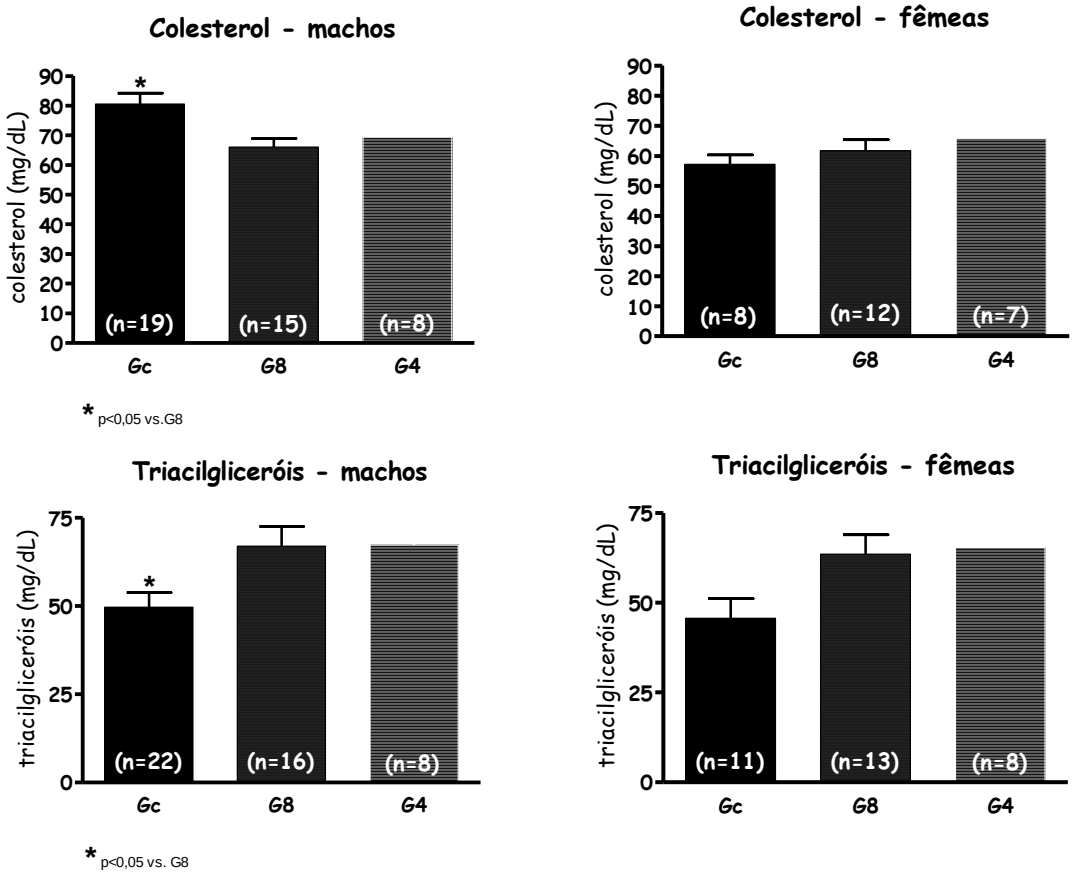


Figura 12 – Colesterol e triacilgliceróis na 12ª semana de ratos Wistar machos e fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4).

Massa renal

Não houve diferença na massa renal entre os grupos em machos e fêmeas com valores corrigidos e sem correção pelo peso corpóreo (figura 13).

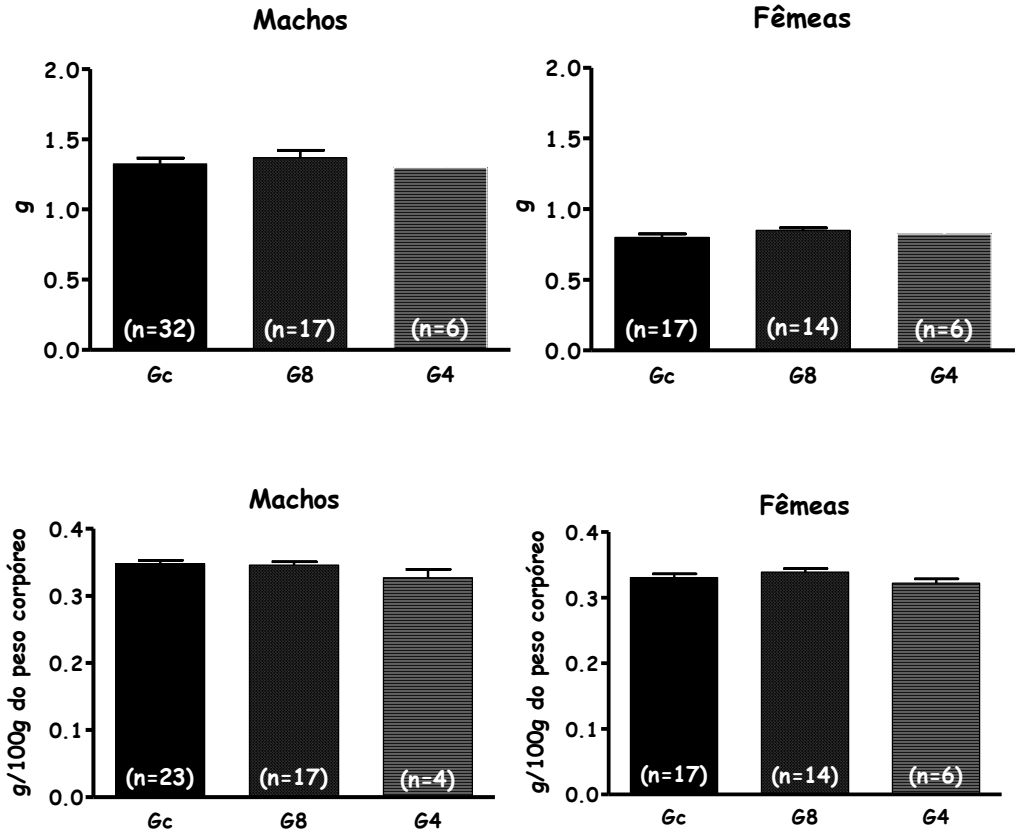


Figura 13 – Massa renal sem correção e corrigido pelo peso corpóreo na 12ª semana de ratos Wistar machos e fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4).

Massa ventricular

Não houve diferença na massa ventricular esquerda entre os grupos em machos e fêmeas com valores corrigidos e sem correção pelo peso corpóreo (figura 14).

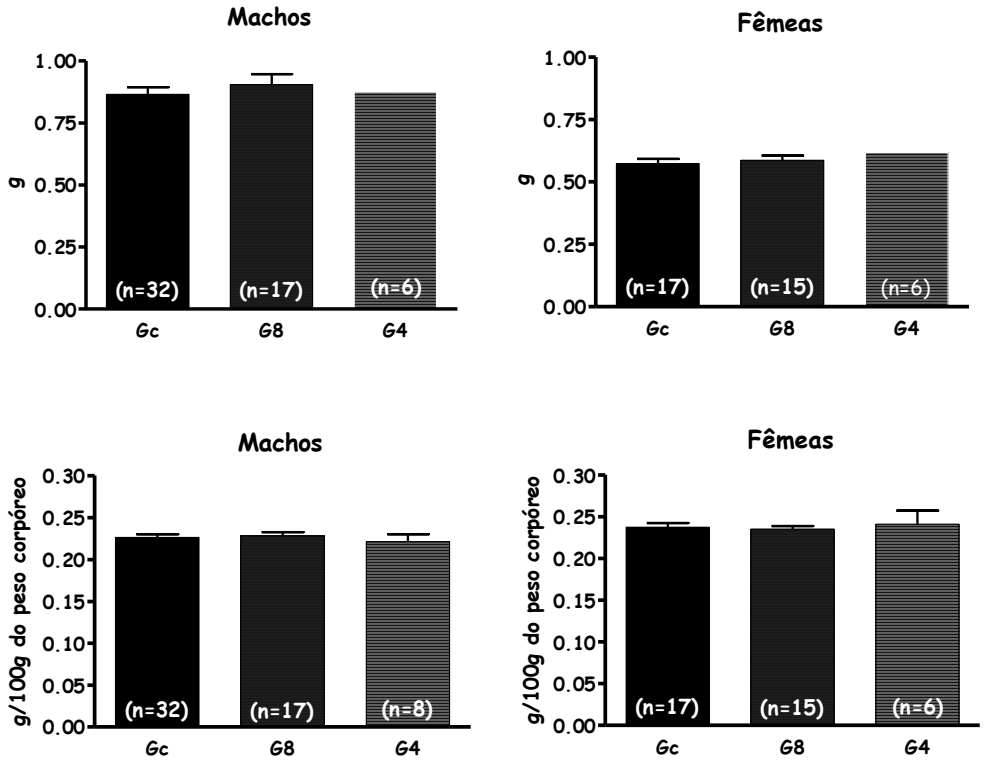


Figura 14 – Massa do ventricular esquerda sem correção e corrigido pelo peso corpóreo na 12ª semana de ratos Wistar machos e fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4).

Peso corpóreo, índice de adiposidade, consumo de ração e massa de tecido adiposo marrom

Não houve diferença no peso corpóreo e na massa do tecido adiposo marrom (BAT) entre os machos dos grupos experimentais. O índice de adiposidade foi maior ($p<0,05$) em machos do grupo G4 comparado aos grupos Gc e G8. O consumo de ração foi menor ($p<0,05$) no grupo G4 comparado aos grupos Gc e G8 (figura 15).

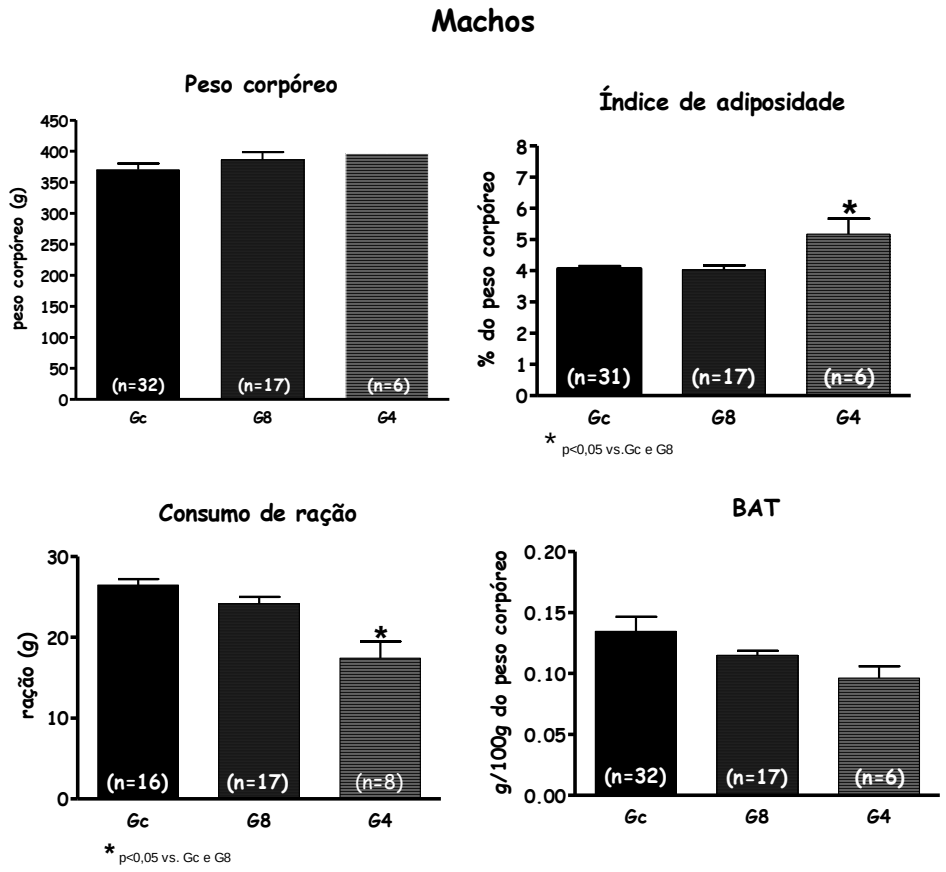


Figura 15 - Peso corpóreo, índice de adiposidade, consumo de ração e peso do tecido adiposo marrom na 12ª semana de ratos Wistar machos nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4).

Nas fêmeas, não houve diferença no peso corpóreo, consumo de ração e massa do tecido adiposo marrom (BAT) entre os grupos experimentais. O grupo G4 teve maior ($p<0,05$) índice de adiposidade comparado ao índice de adiposidade dos grupos Gc e G8 (figura 16).

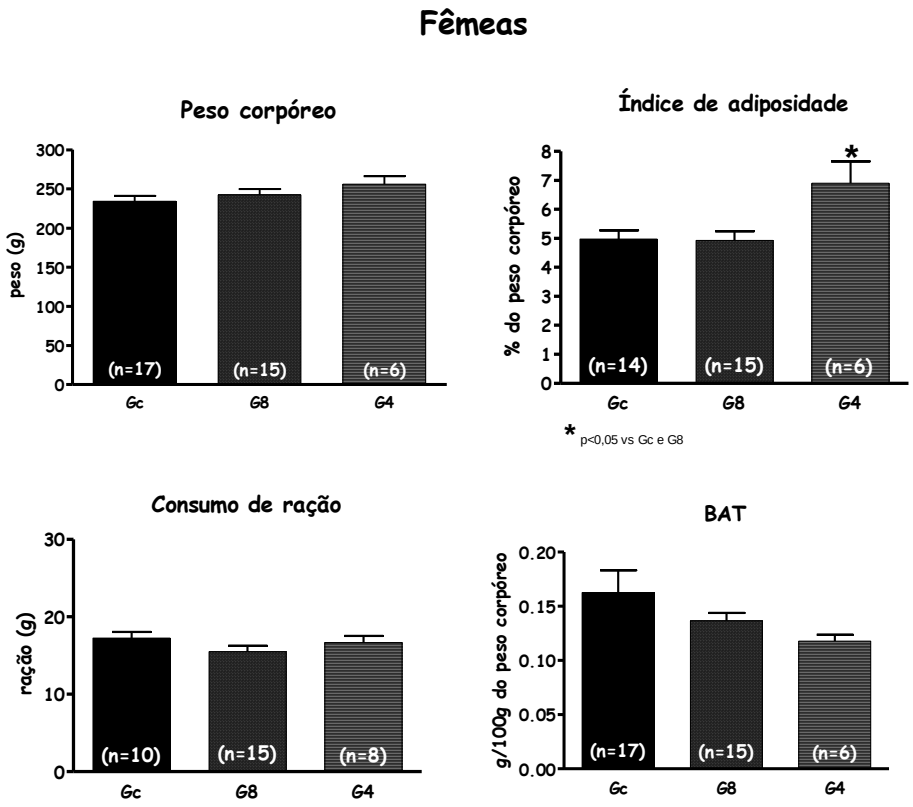


Figura 16 - Peso corpóreo, índice de adiposidade, consumo de ração e peso do tecido adiposo marrom na 12ª semana de ratas Wistar fêmeas nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4).

Ingestão hídrica e diurese

A ingestão hídrica foi maior ($p<0,05$) no grupo Gc em machos comparado a ingestão hídrica do grupo G4. A diurese foi maior ($p<0,05$) nos grupos Gc e G8 do que no grupo G4 em machos. Nas fêmeas não houve diferenças entre os grupos (figura 17).

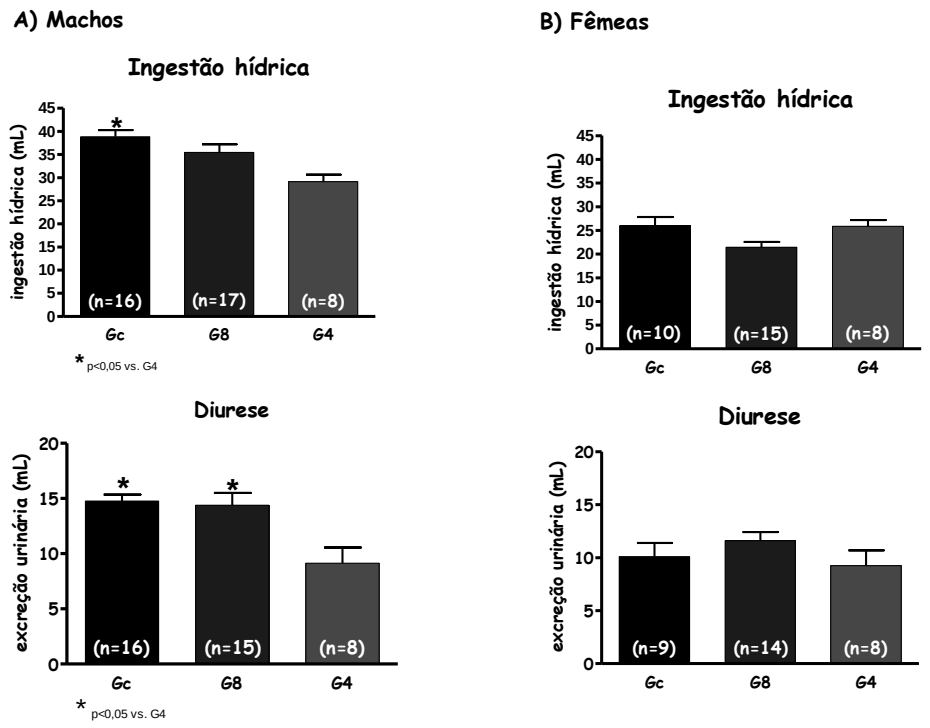


Figura 17 – Ingestão hídrica e diurese na 12ª semana de ratos Wistar machos (painel A) e fêmeas (painel B) nos grupos prole completo (Gc), reduzido a oito filhotes (G8) e reduzido a quatro filhotes (G4).

6 DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo com relação às variáveis hemodinâmicas e metabólicas são influenciados pela manipulação do tamanho da prole ao nascimento. O estudo mostrou que restringir o tamanho da prole aumenta o peso corpóreo além de induzir alterações metabólicas e obesidade na vida adulta.

Muitos estudos têm avaliado as intervenções nutricionais durante a gestação como papel no desenvolvimento de disfunção cardiovascular e metabólica em indivíduos adultos [10-12 16-23]. No entanto, poucos estudos avaliam o efeito das intervenções nutricionais durante a vida pós-natal precoce [47]. Por isso, o presente estudo concentra-se em avaliar o efeito da superalimentação através da redução do tamanho da prole após 24 horas do nascimento [48].

Foram observados novos resultados relevantes. O maior ganho de peso foi encontrado em machos e fêmeas do grupo G4 desde o início da vida pós-natal até a vida adulta na 11ª semana de idade. Essa diferença iniciada no período de aleitamento sugere que o maior ganho de peso pode ser devido a maior oferta de alimento entre as proles do grupo G4, sendo que no grupo de quantidade de proles maior pode haver uma competição por alimento. Resultados semelhantes foi relatado por Conceição et al. [48]. Plagemann et al [41, 42] e Waterland et al [44] verificaram que as proles reduzidas ao nascimento apresentaram maior desenvolvimento e peso corpóreo no período de aleitamento. Waterland e colaboradores [44] afirmam que pequenas ninhadas foram supernutridas durante esse período através da maior ingestão de leite e as grandes ninhadas subnutridas. O crescimento dos recém-nascidos durante o aleitamento pode estar relacionado com a qualidade e quantidade do leite materno [13]. Esse crescimento rápido dos neonatos do grupo G4 poderia ser devido alterações na função mamária. O volume de leite secretado e as suas características bioquímicas são resultado de processos de transporte e de secreção reguladas por processos hormonais e fatores fisiológicos[49]. No entanto, no estudo de O´Dowd et al [13], a prole de tamanho reduzido pós-natal

apresentou uma menor taxa de crescimento do que as proles de grupos que não tiveram redução no tamanho. Os resultados conflitantes entre o presente estudo e o estudo de O´Dowd et al[13] pode ser devido à diferenças no protocolo experimental. Ratas do estudo de O´Dowd et al. foram submetidas a uma cirurgia *sham* no 18° dia de gestação, que pode ter influenciado o período fetal e início do desenvolvimento pós-natal, bem como a função mamária.

O maior ganho de peso corporal no grupo G4 encontrados no presente estudo é um indicativo de obesidade comprovado por um maior índice de adiposidade observado na 12ª semana de idade em machos e fêmeas. A obesidade resulta da diferença entre ingestão e gasto de energia. Ingestão excessiva de alimento é frequentemente a maior causa de obesidade, mas um gasto energético reduzido pode contribuir para maior armazenagem de triglicérides e para obesidade [50]. Cryer et al. [45] encontraram obesidade em ratos criados em pequenas ninhadas. Esses animais têm depósitos adiposos e células adiposas maiores que animais de grandes ninhadas.

Plagemann[42] observou que o maior desenvolvimento ponderal das proles reduzidas pode levar a obesidade precoce que persiste até a idade adulta e pode estar associada à hiperfagia persistente. A hiperfagia não foi observada nesse trabalho.

O consumo alimentar dos machos adultos do grupo G4 foi menor do que o consumo alimentar dos grupos G8 e Gc, indicando que a obesidade é observada possivelmente devido a um menor gasto energético. Nas fêmeas, o consumo alimentar não foi diferente entre os grupos experimentais indicando mecanismo de obesidade semelhante aos machos. O desenvolvimento das estruturas neurais que participam da regulação do comportamento alimentar inicia-se na vida intrauterina. Durante o período gestacional e período pós-natal, o hipotálamo é vulnerável a influências ambientais que podem modificar tanto sua estrutura quanto a sua função, podendo predispor ao desenvolvimento de patologias metabólicas [51 52].

Os resultados de obesidade e baixo consumo alimentar permite conjecturar um desarranjo no metabolismo energético. Talvez haja um maior

gasto energético nos grupos de grandes ninhadas e menor gasto energético nos ratos de prole reduzida.

Não houve diferença entre os grupos no resultado da massa do BAT. Porém, observa-se uma tendência ao grupo de ratos obesos (G4) possuir uma menor massa de BAT. O valor de massa não significa disfunção, mas pode conjecturar uma possível alteração no metabolismo energético, por talvez uma inatividade. Em modelos animais de obesidade, o BAT geralmente não está desenvolvido ou está inativo. Esta inatividade pode reduzir a oxidação de gordura e assim promover o aumento da adiposidade [(50)]. O tecido adiposo marrom (BAT) possui função termogênica. Quando ativado rapidamente oxida os ácidos graxos e produz calor através da proteína de membrana mitocondrial chamado UCP (proteína de desacoplamento), que ativa a respiração e desvia a energia livre de oxidação para a termogênese [(50)].

Estudos em ratos com expressão de UCP1 aumentada observaram que estes animais não desenvolvem obesidade. Por outro lado, ratos que tiveram o tecido adiposo marrom removido se tornaram obesos, hiperfágicos e desenvolveram resistência à insulina e hiperleptinemia [(53-55)].

Outro resultado interessante foram os níveis de glicose e insulina circulante aumentado no grupo G4 em machos e fêmeas. Estes resultados mostram uma resistência à insulina comprovado pelo índice HOMA também maior nesse mesmo grupo G4 comparado aos grupos Gc e G8 indicando uma menor sensibilidade à insulina. Esse resultado já era esperado quando foi encontrado obesidade nesses ratos, pois já é conhecido que a obesidade é um fator de risco importante para a resistência à insulina [(56-58)]. Conceição et al. [(48)] mostrou alterações na via de sinalização da insulina no fígado de proles adultas que foram superalimentadas durante período pós-natal precoce. Plagemann et al. e Devaskar et al. também mostraram que a criação de ratos em pequenas ninhadas (superalimentação) durante um período pós-natal precoce provoca uma falha na célula β da ilhota pancreática e alterações na sinalização da insulina induzindo a resistência a insulina [(42, 43)]. O menor índice HOMA encontrado nos grupos Gc e G8, grupos de tamanho de prole maior, indicam maior sensibilidade à insulina. López-Soldado et al [(59)] encontraram resultado

semelhante. Segundo esses autores, o maior tamanho de prole é um modelo de desnutrição/subnutrição na vida pós-natal precoce, que pode programar o resultado no índice HOMA observado na prole adulta desse estudo.

O colesterol e triacilgliceróis plasmáticos apresentaram resultados inversos. São necessários mais estudos para compreender os mecanismos que explicam um colesterol plasmático maior e triacilgliceróis menor nos machos do grupo Gc (grupo de prole completa). Algumas das possíveis explicações para esse resultado observado estão na função da tiróide, que regula a expressão hepática de receptores de colesterol [60-62]. Portanto, quando a função da tiróide diminui, a expressão de receptores de colesterol é reduzida com um aumento do colesterol circulante [62]. Além disso, o aumento da atividade motora aumenta a lipoproteína lipase e resulta na diminuição do triacilgliceróis [63, 64]. Embora o peso não tenha aumentado no grupo Gc, a função do tecido adiposo visceral pode ser alterada. Atualmente as células adiposas não são tidas apenas como estruturas de proteção e sustentação, mas como um verdadeiro órgão dotado de intensa atividade endócrina e metabólica. Esse tecido é mais sensível à lipólise, o que seria uma possível explicação para os níveis superiores de triacilgliceróis nesse grupo [65]. López-Soldado et al. [59] encontraram resultados semelhantes à esses. López-Soldado et al. [59] encontrou menor nível de triacilgliceróis e maior nível de colesterol nos grupos criados em grandes ninhadas.

Não houve diferença nos níveis de colesterol e triacilgliceróis plasmáticos em fêmeas. O dimorfismo sexual observado entre machos e fêmeas quanto ao perfil lipídico corrobora com outros estudos que encontraram resultados similares [59,66,67]. Esse resultado pode ser devido a subnutrição/desnutrição causado pelo grande tamanho da ninhada, que Fuente-Martin et al. [67] descreve em seu trabalho.

O presente estudo não mostrou diferenças na massa renal e cardíaca em nenhum dos grupos experimentais.

O tamanho da prole alterou a pressão arterial. A pressão arterial foi maior no grupo completo (Gc) em machos e fêmeas. Esse resultado inesperado é conflitante com um estudo de Plagemann [32] onde a pressão

arterial foi maior nas proles reduzidas. A pressão arterial aumentada era esperada no grupo G4, constituído por animais obesos e com resistência à insulina, essas características estão associadas com aumento da pressão sanguínea [68, 69]. Uma possível explicação seria a subnutrição causada devido à criação dessa prole em grandes ninhadas, semelhante aos resultados observados em modelo de restrição protéica. Nesse modelo, o aumento da pressão arterial também é encontrado em proles adultas [70]. Mais estudos são necessários para entender melhor os mecanismos relacionados ao aumento da pressão arterial em proles criadas em grande ninhada.

O conjunto desses resultados permite afirmar que a manipulação do tamanho da prole ao nascimento está associada com alterações metabólicas na vida adulta. O tamanho pequeno da prole está associado com obesidade, possíveis alterações no metabolismo energético e resistência à insulina na prole adulta. Sendo assim, a interferência em manipular o tamanho da prole tem efeito significativo sobre os machos e menor efeito nas fêmeas. Logo, em estudos sobre programação fetal é necessário decidir sobre a manipulação do tamanho da ninhada levando em conta a interpretação dos resultados observados.

7 CONCLUSÃO

O conjunto desses resultados permite sugerir que a manipulação do tamanho da prole ao nascimento está associada com alterações metabólicas na vida adulta. A interferência em manipular o tamanho da prole tem efeito significativo sobre os machos e menor efeito nas fêmeas. Logo, em estudos sobre programação fetal é necessário decidir sobre a manipulação do tamanho da ninhada levando em conta a interpretação dos resultados observados.

8 REFERÊNCIAS (*)

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

2. Barker DJP. The fetal origins of hypertension. *J Hypertens* 1996; 14:117-20.

3. Barker DJP. Maternal nutrition and cardiovascular disease. *Nutr Health* 1993; 9: 99-106.

4. Jackson AA. Nutrients, Growth, and the Development of Programmed Metabolic Function. *Adv Exp Med Biol* 2000; 478: 41-550.

5. Vickers MH. Developmental programming of the metabolic syndrome-critical windows for intervention. *World J Diabetes* 2011; 2 (9): 137-48.

6. Pardi G, Marconi AM, Cetin I. Placental-fetal interrelationship in IUGR foetuses – A Review. *Placenta* 2002 23: S136-S141

7. Cetin I, Alvino G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport- A Review. *Placenta* 2008 23: S77-82.

8. Marconi AM, Paolini CL. Nutrient transport across the intrauterine growth-restricted placenta. *Semin Perinatol* 2008 32: 178-181

9. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Ribeiro AACM, Mayhew TM et al. Particulate urbana ir pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod* 2008 79: 578-584.

10. Khattabi IE, Remacle C, Reusens B.The regulation of IGFs and IGFBPs by prolactin in primary culture of fetal rat hepatocytes is influenced by maternal malnutrition. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006 291: E835-42.

11. Desai M, Babu J, Ross MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp* Physiol 2007 293: R2306-14.

12. Rhodes P, Craigon J, Gray C, Rhind SM, Loughna PT, Gardner DS. Adult-onset obesity reveals prenatal programming of glucose-insulin sensitivity in male sheep nutrient restricted during late gestation. *PLoS ONE* 2009 4: e7393.

13. O´Dowd R, Kent JC, Moseley JM, Wlodek ME. Effects of uteroplacental insufficiency and reducing litter size on maternal mammary function and postnatal offspring growth. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2007 294: R539-48.

14. Siebel AL, Mibus A, de Blasio MJ, Westcott KT, Morris MJ et al. Improved lactational nutrition and postnatal growth ameliorates impairment of glucose tolerance by uteroplacental insufficiency in male rat offspring. *Endocrinology* 2008 149: 3067-76.

15. Neitzke U, Harder T, Plagemann A. Intrauterine growth restriction and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal. *Microcirculation* 2011 18: 304-11.

16. Ramos DR, Costa NL, Jang KL, Oliveira IB, da Silva AA et al. Maternal high-sodium intake alters the responsiveness of the renin-angiotensin system in adult offspring. *Life Sci* 2012 90: 785-92.

17. Alves-Rodrigues EN, Veras MM, Rosa KT, de Castro I, Furukawa LN et al. Salt intake during pregnancy alters offspring's myocardial structure. Nutr Metab Cardiovasc Dis:

18. Silva AA, Noronha IL, 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: 133-9.

19. 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. *Physiology & Behavior* 2008; 95: 145-51.

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

21. Vidonho AFJr, Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, Furukawa LN, Campos RR, Toledo Bergamaschi CC, Carpinelli AR, Quintão EC, Dolnikoff MS, Heimann JC. Perinatal Salt Restriction: A New Pathway to Programming Insulin Resistence and Dyslipidemia in Adult Wistar Rats. *Pediatric Research* 2004; 56: 842-48.

22. Ding Y, Lv J, Mao C, Zhang H, Wang A et al. High-salt diet during pregnancy and angiotensin-related cardiac changes. *J Hypertens* 2010 28: 000-000

23. Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. *British Journal of Nutrition* 2009.

24. Dijik G, Kacsándi A, Kóbor-Nyakas DÉ, Hogyes E, Nyakas C. Perinatal polyunstaurated fatty acids supplementation causes alterations in fuel homeostasis in adult male rats but does not offer resistance against STZ-induced diabetes. *Horm Metab Res* 2011; 43: 938-43.

25. Wei J, Lin Y, Li Y, Ying C, Chen J, Song L, Zhou Z, Lv Z, Xia W, Chen X, Xu S. Perinatal exposure to bisphenol A at reference dose predisposes offspring to metabolic syndrome in adult rats on a high-fat diet. *Endocrinology* 2011; 152: 3049-61.

26. Orozco-Solís R, Matos RJB, Souza SL, Grit I, Kaeffer B, Castro RM, Bolaños-Jiménez F. Perinatal nutrient restriction induces long-lasting alterations in the circadian expression pattern of genes regulating food intake and energy metabolism. *International Journal of Obesity* 2011; 35: 990-1000.

27. Oliveira E, Moura EG, Santos-Silva AP, Pinheiro CR, Lima NS, Nogueira-Neto JF, Nunes-Freitas AL, Abreu-Villaça Y, Passos MCF, Lisboa PC. Neonatal nicotine exposure causes insulin and leptin resistance and inhibits hypothalamic leptin signaling in adult rat offspring. *J Endocrinoly* 2010; 206: 55-63

28. Oliver Chen C-YO, Crott J, Liu Z, Smith D. Fructose and saturated fats predispose hyperinsulinemia in lean male rat offspring. *Eur J Nutr* 2010; 49: 337-43.

29. Padmavathi IJ, Kishore YD, Venu L, Ganeshan M, Harishankar N, Giridharan NV, Raghunath M. Prenatal and perinatal zinc restriction: effects on body composition, glucose tolerance and insulin response in rat offspring. *Exp Physiol* 2009; 6: 761-9.

30. Orozco-Sólis R, Lopes SS, Barbosa RJM, Grit I, Le Bloch J, Nguyen P, Manhães RC, Bolaños-Jiménez F. Perinatal undernutrition-induced obesity

is independent of the developmental programming of feeding. *Physiol Behav* 2009; 96: 481-92.

31. Boullu-Ciocca S, Achard V, Tassistro V, Dutour A, Grino M. Postnatal programming of glucocorticoid metabolism in rats modulates high-fat diet-induced regulation of visceral adipose tissue glucocorticoid exposure and sensitivity and adiponectin and proinflammatory adipokines gene expression in adulthood. *Diabetes* 2008; 57: 669-77.

32. Plagemann A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. *Horm Res* 2006; 65: 83-9.

33. Venu L, Kishore YD, Raghunath M. Maternal and perinatal magnesium restriction predisposes rat pups to insulin resistance and glucose intolerance. *J Nutr* 2005; 135 (6): 1353-8.

34. Levin BE, Magnan C, Migrenne S, Chua SCJr, Dunn-Meynell AA. F-DIO obesity-prone rat is insulin resistant before obesity onset. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 289(3): 704-11.

35. Lane RH, Macleannan NK, Daood MJ, Hsu JL, Janke SM, Pham TD, Puri AR, Watchko JF. IUGR alters postnatal rat skeletal muscle peroxisome proliferator-aactivated receptor-gamma coactivator-1 gene expression in a fiber specific manner. *Pediatr Res* 2003; 53: 994-1000.

36. Plagemann A, Rittel F, Wass T, Harder T, Rohde W. Cholegecystokinin-8S levels in discrete hypothalamic nuclei of weanling rats exposed to maternal protein malnutrition. *Regul Pept* 1999; 85: 109-13.

37. Plagemann A, Rake A, Harder T, Melchior K, Rohde W, Dorner G. Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Neuroscience Letters* 1998; 258: 13-6.

38. Harder T, Plagemann A, Rohde W, Doner G. Syndrome X-like alterations in adult female rats due to neonatal insulin treatment. *Metabolism* 1998; 47: 855-62.

39. Holemans K, Bree RV, Verhaeghe J, Meurrens K, Assche AV. Maternal semistarvation and streptozotocin-diabetes in rats have different effects on the in vivo glucose uptake by peripheral tissues in their female adult offspring. *J Nutr* 1997; 127: 1371-6.

40. Dorner G, Plagemann A. Perinatal hyperinsulinism as possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Horm Metab Res* 1994; 26: 213-21.

41. Plagemann A, Harder T, Rake A, Voits M, Fink H, Rohde W, Dorner G. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Res* 1999; 836: 146-55.

42. Plagemann A, Harder T, Rake A, Waas T, Melchior K, Ziska T, Rohde W, Dorner G. Observations on the orexigenic hypothalamic neuropeptide Y-system in neonatally overfed weanling rats. *J Neuroendocrinol* 1999; 11: 541-6.

43. Devaskar US, Thamotharan M. Metabolic programming in the pathogenesis of insulin resistance. *Rev Endocr Metab Disord* 2007; 8: 105-13.

44. Walerland RA, Garza C. Early postnatal nutrition determines dult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. *J Nutr* 2002; 132: 357-64.

45. Cryer A, Jones HM. Effects of litter size on the lipoprotein lipase activity of four adipose-tissue depots, serum immunoreactive insulin and tissue

cellularity during the first four weeks of life in the rat. *Biochem J* 1979; 178: 711-24.

46. Hahn P. Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue anzymes in adult rodents. *J Nutr* 1984; 114: 1231-4.

47. Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, Taylor PD. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005; 288: R127-R133.

48. Conceição EPS, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TAS, Peixoto-Silva N, Passos MCF, Moura EG, Lisboa PC. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition – role of insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 81-87.

49. McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2002; 55: 629 – 641.

50. Ricquier, D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. C. R. *Biologies* 2006; 329: 578-86.

51. Bear M, Connors BW, Paradiso MA. Neurociências: Desvendando o Sistema Nervoso. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

52. Guyton AC, Hall JE. Fisiologia Humana e Mecanismos das doenças. 6 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1998.

53. Sell H, Deshaies Y, Richard D. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; 36(11): 2098-104.

54. Monemdjou S, Hofmann WE, Kozak LP, Harper ME. Increased mitochondrial proton leak in skeletal muscle mitochondria of UCP1-deficient mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000; 279(4): 941-6.

55. Kozak LP, Harper ME. Mitochondrial uncoupling proteins in energy expenditure. *Annu Rev Nutr* 2000; 20: 339-63.

56. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. *Diabetes* 1995; 44: 863-70.

57. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 7-18.

58. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. *Front Med* 2013; 7: 14-24

59. López-Soldado I, Munilla MA, Herrera E. Long-term consequences of under-nutrition during suckling on glucose tolerance and lipoprotein profile in female and male rats. *Br J Nutr* 2006; 96: 1030-7

60. Baxter JD, Dillmann WH, West BL, Huber R, Furlow JD et al. Selective modulation of thyroid hormone receptor action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001; 76: 31-42

61. Ness GC. Thyroid hormone. Basis for its hypocholesterolemic effect. *J Fla Med Assoc* 1991; 78: 383-5.

62. Duntas LH. Thyroid disease and Lipids. *Thyroid* 2002; 12: 287-93.

63. Gill JM, Herd SL, Tsetsonis NV, Hardman AE. Are the reductions in triacylglycerol and insulin levels after exercise related? *Clin Sci (Lond)* 2002; 102: 223-31.

64. Harrison M, Moyna NM, Zderic TW, O'Gorman DJ, McCaffrey N, Carson BP and Hamilton MT. Lipoprotein particle distribution and skeletal muscle lipoprotein lipase activity after acute exercise. *Lipids Health Dis* 2012; 11: 64.

65. Hassing HC, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdorp M, Dallinga-Thie GM. Pathophysiology of hypertriglyceridemia. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1821: 826-32.

66. Bassett DR, Craig BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *J Appl Physiol* 1988; 64: 1249-56.

67. Fuente-Martín E, Granado M, García-Cáceres C, Sanchez-Garrido MA, Frago LM et al. Early nutritional changes induce sexually dimorphic long-term effects on body weight gain and the response to sucrose intake in adult rats. *Metabolism* 2012; 61: 812-22.

68. Barker DJP, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Maternal and social origins of hypertension. *Hypertension* 2007; 50: 565-71.

69. de Oliveira Leal V, Mafra D. Adipokines in obesity. *Clin Chim Acta* 2013; 419: 87-94.

70. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. *Pediatr Res* 2001; 49: 460-67.

(*) De acordo com: Adaptado do *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver Style) 2005. Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

MANUSCRITO DO “PAPER” SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO

From: Physiology & Behavior
Sent: Monday, May 20, 2013 2:49 PM
To: jheimann@usp.br
Subject: Submission Confirmation

Dear Dr. Joel C. Heimann,

Your submission entitled "Litter size manipulation alters hemodynamics, carbohydrate metabolism and energy expenditure differently in male and female offspring in rats" has been received by Physiology & Behavior

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is http://ees.elsevier.com/phb/.

Your username is: jheimann@usp.br

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/phb/automail_query.asp

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been
assigned.
Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,
Elsevier Editorial System
Physiology & Behavior

Title: Litter size manipulation alters hemodynamics, carbohydrate metabolism and energy expenditure differently in male and female offspring in rats

Running title: Litter size manipulation

Authors: Neuziane Kloos Amorimn Tavares, Fernanda de Jesus Aguiar, Cássia Oliveira, Ivone Braga de Oliveira, Luzia Naôko Shinohara Furukawa, Joel C. Heimann

Name and address of corresponding author:

Joel C. Heimann

Avenida Doutor Arnaldo, 455 – room 3342

01246-903 São Paulo, SP

Brazil

ABSTRACT

During intrauterine life, the developing fetus is susceptible to environmental changes that can alter the phenotype of the individual in postnatal life. This phenomenon is called fetal programming. Events that occur during critical periods of rapid cell division may alter the structure and function of organ systems, resulting in consequences both early (low birth weight) and late (diseases in adulthood) in life. The experimental protocols of most of the studies on fetal programming involve a reduction in litter size soon after birth. This approach hampers the interpretation and reproducibility of the observed results. The purpose of this investigation was to determine if blood pressure, carbohydrate metabolism and energy expenditure in adult offspring are influenced by litter size. Female Wistar rats were fed standard rat chow *ad libitum* and were mated with male rats at 12 weeks of age. After birth, the offspring were divided into three groups: unchanged litter size (GU), culled to eight neonates (G8) and culled to four neonates (G4). At 12 weeks of age, the body weight; blood pressure; food intake; glucose, insulin, cholesterol and triacylglycerol levels; brown adipose tissue mass; adiposity index; renal mass; and cardiac mass were determined. The body weight, adiposity index, glucose level, insulin level and HOMA index were higher in males and females in the G4 group than in the G8 and GU groups. However, food consumption was lower in G4 males. The blood pressure was higher in the GU group. In summary, a small litter size is related to obesity, possible alterations in energy expenditure and insulin resistance in adult offspring.

KEYWORDS: litter size, insulin resistance, adiposity, blood pressure.

1.0 INTRODUCTION

In 1977, Anders Forsdahl, a Norwegian researcher, published an epidemiological study suggesting a cause-effect relationship between early life environmental factors and diseases in adult life [1]. More than a decade later, two British researchers, David J. P. Barker, an epidemiologist, and Clive Osmond, a biostatistician, published an interesting study [2]. These authors found an association between previous infant undernutrition and mortality due to coronary ischemic disease in an adult population in England and Wales. They had the great advantage of perceiving the importance of these findings. In 1992, Hales and Barker proposed a theory called the "fetal programming theory" to explain the association between phenomena that occur in early life and alterations in adulthood [3]. The central mechanism of this theory was called the "Thrifty Phenotype" or "Economic Phenotype." This phenotype is the result of responses to insults that occur in utero or during the early postnatal period. Poor nutritional conditions during pregnancy can alter the development of a fetus to prepare that offspring for survival in an environment with low nutritional resources. In addition to undernutrition during pregnancy, reduced nutrient delivery and oxygen supply from the mother across the placenta can impair fetal growth [4-7]. Low placental perfusion and/or reduced placental function are the main causes of limited flow of nutrients and oxygen to the fetus [4-7]. Reduced growth, represented mainly by a low birth weight, is the primary result of a suboptimal intrauterine environment and is associated with chronic conditions in adulthood, such as obesity, hypertension, insulin resistance, type 2 diabetes mellitus, coronary heart disease, stroke, renal functional impairment and others [8].

The study of the mechanistic adaptations responsible for fetal programming in humans is limited due to ethical issues and the absence of appropriate technologies. As

a result, several animal models have been developed. Some of these models involve maternal protein [9] or caloric restriction [10,11], uteroplacental under perfusion [12-14] and maternal high- or low-salt intake [15-22]. All these models lack standardization of the experimental protocol, which hampers the interpretation and reproducibility of the observed results. The intensity and duration of the insult during the perinatal period and the early postnatal features need to be standardized to allow the comparison of the results obtained in different studies to better understand fetal programming.

Litter size is one of the features that varies among the studies on fetal programming. We have shown that male adult offspring of Wistar rat dams fed a low-salt diet from before pregnancy until the end of lactation are insulin resistant [20]. In this study, offspring were culled to eight pups (four males and four females) on the day of birth. Because it is known that small and large size litters are associated, respectively, with over- and underfeeding during the early postnatal period [23-25], it is possible that the limitation of the litter size may influence the development of insulin resistance associated with salt restriction during the perinatal period. Therefore, we performed a bibliographical search in PubMed using the following key words: fetal programming, insulin resistance in adulthood and rats. Twenty-nine publications were obtained as result of this search. We were able to access the full text of 27 studies. In four studies, the authors did not report whether the litter size was modified. In four studies, the subjects evaluated were fetuses (prior to birth). Eight references were reviews. In seven studies, the litter size was reduced with no justification, and in four studies, the litter size was reduced to avoid differences between the experimental and control groups.

The main purpose of the present study was to determine the effects of overfeeding on weight gain through adulthood, blood pressure and glucose and insulin metabolism in adult male and female Wistar rats using a strategy of litter size reduction

24 hours after birth [26]. We evaluated the three following experimental groups: intact, reduced to four offspring and reduced to eight offspring.

2.0 METHODS

All the experiments described herein were previously approved by the Committee of Research Projects Evaluation of the University of São Paulo School of Medicine, Brazil (certificate number 0978/09).

2.1 Maternal group

Eight-week-old female Wistar rats (*Rattus norvegicus*) from the Institutional Animal Facility of the University of São Paulo School of Medicine were housed under controlled conditions of temperature (22°C), humidity (60%) and lighting (lights on at 06:00 a.m. and lights off at 06:00 p.m.). The rats were fed standard rat chow (Harlan-Teklad, USA) *ad libitum*. At 12 weeks of age, the female rats were mated with male rats that were also fed standard chow *ad libitum*. Body weight (BW) was evaluated from the eighth week of age until the end of lactation. Weekly tail-cuff blood pressure (tcBP) and chow and water consumption measurements were performed from the week before pregnancy until the end of pregnancy.

2.2 Offspring group

On the day of birth, the litter size, the neonates' BWs and the number of stillbirth were determined. The litters were divided into three experimental groups:

Group 1 - Unchanged litter size (GU)

Group 2 - Culled to eight neonates (four males and four females) (G8)

Group 3 - Culled to four neonates (two males and two females) (G4)

The selection of neonates kept with their mothers was performed such that the body weight of the group was similar to the body weight of the whole litter. The neonates that were not selected for inclusion in the experimental groups were decapitated. Trunk blood was collected in plastic tubes and centrifuged for 10 minutes at 3,000 rpm. The serum was stored in a -20ºC freezer for later biochemical analyses. The offspring were weaned at three weeks of age and were fed standard chow thereafter (Nuvital CR-1, Colombo, PR – Brazil). The BW was measured weekly from birth until 12 weeks of age. The tail-cuff blood pressure (TcBP) was measured in 12-week-old offspring.

2.3 Tail-cuff blood pressure measurements

The TcBP was measured with an instrument that detects the rate of tail distention using a piezoelectric sensor in response to each pulse (RTBP 2045 linked to a computer data acquisition system – RTBP 001 – Kent Scientific Corporation, Connecticut, USA). All tcBP determinations were performed on conscious animals in the absence of movement. The means of at least three determinations were considered for statistical analysis.

2.4 Glucose and insulin measurements and HOMA index calculations

Blood was collected from the dorsal tail vein after overnight fasting at 12 weeks of age. The blood was immediately centrifuged to separate the serum, which was stored at -20ºC until determination of the insulin level. The blood glucose concentration was measured using a glucometer (Accu-Chek®, Roche, Mannheim, Germany). The insulin level was measured using an RIA kit for rat insulin (Linco Research, St. Charles, MO). The HOMA index was calculated using the following formula:

HOMA index = blood glucose (mmols.L^{-1}).serum insulin (µU.L^{-1}).22.5^{-1}

2.5 Cholesterol and triacylglycerol measurements

The overnight fasting cholesterol and triacylglycerol levels were determined using an enzymatic method with commercial kits (Labtest Diagnóstica S.A, São Paulo, Brazil).

2.6 Food consumption

At the 12th week of age, all animals from the three experimental groups were transferred to individual metabolic cages (model 650-0100, Nalgene Branch Products, Rochester, NY, USA) for three days. On the third day, food consumption was measured.

2.7 Determination of the brown and white adipose tissue masses and the renal and cardiac masses

At 12 weeks of age, all animals were decapitated. The brown and white adipose tissue and the heart and kidneys were excised for mass determination. The retroperitoneal, gonadal and mesenteric adipose tissue pads were dissected, and the adiposity index was calculated (white adipose tissue mass/body weight x 100). The left and right ventricles were dissected for separate mass measurements.

2.8 Statistical analysis

The data are presented as the mean ± SEM. Comparisons between groups were performed using one- or two-way analysis of variance followed by a post-test using Student-Newman-Keuls or Fisher LSD. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3.0 RESULTS

3.1 Maternal group

From eight weeks of age until the end of pregnancy, no differences were observed between the maternal groups whose litters were unchanged and those whose litters were reduced to eight or four. Therefore, the results for the period until the end of pregnancy are reported for all dams as a single group (Table 1).

3.2 Body weight and food consumption

The area under the curve for the body weight measured over time was higher ($p < 0.05$) during pregnancy than before pregnancy, indicating that pregnancy accelerates body weight gain (before pregnancy 91.6 ± 14.4, n = 8; during pregnancy 144 ± 14.5, n = 11, weeks).

No differences were observed in body weight among the three experimental groups throughout the lactation period (Table 2).

Food consumption was higher ($p < 0.05$) during the first and third weeks of pregnancy than during the week before pregnancy (Table 1).

3.3 Blood pressure

No variation in blood pressure was observed during pregnancy.

3.4 Offspring group

3.4.1 Longitudinal evaluation of body weight

The body weight in males from the 4th week until the 11th week of age was higher ($p < 0.05$) in the G4 group than in the G8 and GU groups, and the body weight in females was higher from the 3rd week until the 11th week of age (Figure 1).

3.4.2 Blood pressure

The results for the adult offspring indicate that maintaining the litter size from birth positively affects the blood pressure. The blood pressure was higher in 12-week-old GU males and females ($p < 0.05$) than in G8 rats (Table 3).

3.4.3 Glucose, insulin, cholesterol and triacylglycerol levels and the HOMA index,

The main findings regarding blood glucose and serum insulin were that the levels were higher ($p < 0.05$) in 12-week-old G4 males and females than in G8 rats (blood glucose) or GU rats (serum insulin).

Twelve-week-old offspring from litters reduced to four newborns were insulin resistant; the HOMA index was higher in G4 rats than in G8 and GU rats for both males and females (Figure 2).

Interestingly, a sexual dimorphism was observed in the serum cholesterol levels. In males, the serum cholesterol level was higher ($p < 0.05$) in the GU group than in the G8 group, whereas in females, no differences were observed in the serum cholesterol levels among the three experimental groups (Table 3). The serum triacylglycerol levels were lower ($p < 0.05$) in GU rats than in G8 rats for males but not females (Table 3).

3.4.4 Renal and cardiac mass

The renal and left ventricular masses (both corrected by body weight and uncorrected) did not differ among the three experimental groups (Table 3), indicating the lack of a possible hypertrophic effect on adult offspring due to changes in the neonatal litter size.

3.4.5 Body weight, adiposity index, brown adipose tissue mass and food consumption

In males, the adiposity index was higher ($p < 0.05$) in the G4 group than in the G8 and GU groups (Figure 3), although no differences were observed in body weight or brown adipose tissue mass among the groups. Interestingly, despite the higher ($p < 0.05$) adiposity index in G4 males, food consumption was lower ($p < 0.05$) in the G4 group than in the G8 and GU groups (Figure 3).

In females, the adiposity index was higher ($p < 0.05$) in the G4 group than in the G8 and GU groups (Figure 3), with no simultaneous differences in body weight, food intake or brown adipose mass among the experimental groups (Figure 3).

4.0 DISCUSSION

Many studies have attempted to determine whether nutritional interventions during gestation have a role in the development of cardiovascular and metabolic dysfunction in adult individuals [9-11,15-22]. However, only a limited number of studies have evaluated the effect of nutritional interventions during early postnatal life [27]. To address this gap in the literature, we assessed the effects of overfeeding on weight gain through adulthood and on blood pressure, the glucose and insulin levels and lipid metabolism in adult male and female Wistar rats using a strategy of litter size reduction 24 hours after birth [26].

We obtained relevant new results in the present study. Greater body weight gains were found in males and females in the G4 group from the early postnatal period until the 11th week of age, similar to what was reported by Conceição et al. [26]. The growth of neonates during lactation is related to the quality and quantity of milk provided by the dams [12]. The faster growth of the neonates in the G4 group could be due to

alterations in mammary function. The volume of milk secreted and its biochemical characteristics are the result of transport and secretory processes that are regulated by complex hormonal, developmental and physiological factors [28]. However, in the study of O'Dowd et al. [12], the offspring of the group with postnatal reduced litter size had a slower growth rate than the offspring of the control group. The discordance of the results between the present study and the study of O'Dowd et al. [12] may be due differences in the experimental protocol. The dams used in the study of O'Dowd et al. were submitted to a sham surgery on day 18 of pregnancy that may have influenced fetal and early postnatal development as well as mammary function. The higher body weight gains in small litters found in the present study are indicative of obesity because a higher adiposity index was observed in 12-week-old males and females in this experimental group. It is known that obesity is a consequence of high caloric intake [29-31] and/or low energy expenditure due to energy metabolism alterations [29-31] or a sedentary life style [32]. Food consumption was lower in adult G4 males than in G8 and GU males, indicating that the observed obesity may have been due to lower energy expenditures. In females, food consumption was not different between the G4 group and the other two experimental groups, indicating that the mechanism of obesity was similar to that discussed for males. Other interesting observations were the higher circulating levels of glucose and insulin in adult G4 males and females. These results are suggestive of a state of insulin resistance, which is supported by the higher HOMA indexes found for adult male and female rats in the G4 group compared with the G8 and GU rats. Both adult GU males and females had higher adiposity indexes, a result that is not surprising as it has been known for many years that obesity is an important risk factor for insulin resistance [33-35]. Evidence of insulin resistance was previously reported by Conceição et al. [26], who showed that there were alterations in the insulin

signaling pathway in the livers of adult offspring that were overfed during the early postnatal period. In addition, the lower HOMA indexes found in both groups (GU and G8) with larger litter sizes indicate enhanced insulin sensitivity, similar to the results reported by López-Soldado et al. [36]. According to these authors, a larger litter size serves as a model of undernutrition in early postnatal life and may program the observed results for the HOMA index in adult offspring in the present study.

Further studies are needed to better understand the mechanisms responsible for the higher plasma cholesterol and lower triacylglycerol levels in GU males but not in GU females. There are some possible explanations for this observed result. Thyroid function regulates the hepatic expression of cholesterol receptors [37-39]. Therefore, when thyroid function is decreased, the expression of cholesterol receptors is reduced, with a consequent increase in the circulating cholesterol level [39]. Furthermore, increased motor activity increases the level of lipoprotein lipase and results in decreased triacylglycerol levels [40,41]. In addition, although the body weight was not different between the adult GU rats and the rats in the other groups, the visceral adipose tissue function could have been altered. This tissue is more sensitive to lipolysis, which could explain the higher triacylglycerol levels in this group [42]. A large litter size is a model of undernutrition, as previously shown in a study by López-Soldado et al. [36]. These authors obtained results similar to those found in the present study.

The sexual dimorphism observed in the plasma cholesterol and triacylglycerol levels in adult GU offspring is in accordance with the results of other studies that obtained similar results [36,43,44]. Most likely, this result is due to the undernutrition caused by the large litter size, as Fuente-Martin et al. [44] described in a previous study.

An unexpected result was the higher blood pressures in both males and females in the GU group. It was expected that the blood pressure would be higher in the

offspring in the G4 group because these rats were obese and insulin resistant, characteristics that linked to increased blood pressure [45,46]. One explanation could be undernutrition caused by the large litter size, similar to the results obtained with the maternal low-protein model. In this model, higher blood pressure was also found in adult offspring [47]. Further studies are needed to elucidate the mechanisms related to the higher blood pressure observed in the GU rats.

5.0 CONCLUSIONS

In summary, a small litter size is associated with obesity, possible alterations in energy expenditure and insulin resistance in adult offspring. Litter size manipulation had significant effects on male rats but did not influence female offspring. Therefore, in studies of fetal programming, the effects of litter size manipulation must be taken into account when interpreting the observed results.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by a grant (2010/03895-0) from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

We thank Walter Campestre for the competent animal care and our colleagues at the Laboratory of Experimental Hypertension of Department of Internal Medicine of the University of Sao Paulo School of Medicine for their excellent technical assistance.

CONFLICT OF INTEREST

None of the authors have any financial or non-financial competing interests concerning the present study.

REFERENCES

1. 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.
2. Barker DJP, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. Lancet 1986;1:1077–81.
3. Hales CN, Barker DJ. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. Diabetologia 1992;35:595–601.
4. Pardi G, Marconi AM, Cetin I. Placental-fetal interrelationship in IUGR fetuses—a review. Placenta 2002;23:S136–41.
5. Cetin I, Alvino G. Intrauterine growth restriction: implications for placental metabolism and transport. A review. Placenta 2008;23:S77–82.
6. Marconi AM, Paolini CL. Nutrient transport across the intrauterine growth-restricted placenta. Semin Perinatol 2008;32:178–81.
7. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Ribeiro AACM, Mayhew TM, Saldiva PHN, et al. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. Biol Reprod 2008;79:578–84.
8. Franco MCP, Nigro D, Fortes ZB, Tostes RCA, Carvalho MHC, Lucas SRR, et al. Intrauterine undernutrition—renal and vascular origin of hypertension. Cardiovasc Res 2003;60:228–34.
9. Khattabi IE, Remacle C, Reusens B. The regulation of IGFs and IGFBPs by prolactin in primary culture of fetal rat hepatocytes is influenced by maternal malnutrition. Am J Physiol Endocrinol Metab 2006;291:E835–42.
10. Desai M, Babu J, Ross MG. Programmed metabolic syndrome: prenatal undernutrition and postweaning overnutrition. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007;293:R2306–14.

11. Rhodes P, Craigon J, Gray C, Rhind SM, Loughna PT, Gardner DS. Adult-onset obesity reveals prenatal programming of glucose-insulin sensitivity in male sheep nutrient restricted during late gestation. PLoS ONE 2009;4:e7393.

12. O'Dowd R, Kent JC, Moseley JM, Wlodek ME. Effects of uteroplacental insufficiency and reducing litter size on maternal mammary function and postnatal offspring growth. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2007;294:R539–48.

13. Siebel AL, Mibus A, de Blasio MJ, Westcott KT, Morris MJ, Prior L, et al. Improved lactational nutrition and postnatal growth ameliorates impairment of glucose tolerance by uteroplacental insufficiency in male rat offspring. Endocrinology 2008; 149: 3067-76.

14. Neitzke U, Harder T, Plagemann A. Intrauterine growth restriction and developmental programming of the metabolic syndrome: a critical appraisal. Microcirculation 2011;18:304–11.

15. Leandro ML, Furukawa LNS, Shimizu MHM, Casarini DE, Seguro AC, Parriarca G, et al. 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;95:145–51.

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

17. 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 Sci 2007;82:728–32.

18. Ramos DR, Costa NL, Jang KL, Oliveira IB, da Silva AA, Heimann JC, et al. Maternal high-sodium intake alters the responsiveness of the renin-angiotensin system in adult offspring. Life Sci 2012;90:785–92.

19. Alves-Rodrigues EN, Veras MM, Rosa KT, de Castro I, Furukawa LN, Oliveira IB, et al. Salt intake during pregnancy alters offspring's myocardial structure. Nutr Metab Cardiovasc Dis 2013;23:481–6.

20. Vidonho AF, da Silva AA, Catanozi S, Rocha JC, Beutel A, Carillo BA, et al. Perinatal salt restriction: a new pathway to programming insulin resistance and dyslipidemia in adult Wistar rats. Pediatr Res 2004;56:842–8.

21. 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.

22. Elahi MM, Cagampang FR, Mukhtar D, Anthony FW, Ohri SK, Hanson MA. Long-term maternal high-fat feeding from weaning through pregnancy and lactation predisposes offspring to hypertension, raised plasma lipids and fatty liver in mice. Br J Nutr 2009:102:514–9.

23. Plagemann A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. Horm Res 2006;65:83–9.

24. Plagemann A, Rake A, Harder T, Melchior K, Rohde W, Dorner G. Reduction of cholecystokinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. Neurosci Lett 1998;258:13–6.

25. Harder T, Plagemann A, Rohde W, Doner G. Syndrome X-like alterations in adult female rats due to neonatal insulin treatment. Metabolism 1998;47:855–62.

26. Conceição EPS, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TAS, Peixoto-Silva N, et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition—role of insulin resistance. J Nutr Biochem 2013;24:81–7.

27. Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2005;288:R127–33.

28. McManaman JL, Neville MC. Mammary physiology and milk secretion. Adv Drug Deliv Rev 2002;55:629–41.

29. Ravussin E, Lillioja S, Knowler WC, Christin L, Freymond D, Abbott WG, et al. Reduced rate of energy expenditure as a risk factor for body-weight gain. New Engl J Med 1988;318:467–72.

30. Schultz Y, Jéquier E. Resting energy expenditure, thermic effect of food, and total energy expenditure. In: Bray GA, James WPT, editors. Handbook of obesity, New York: Marcel Dekker; 1998, p. 443–56.

31. Ricquier, D. Fundamental mechanisms of thermogenesis. C R Biologies 2006;329:578–86.

32. Knight JA. Physical inactivity: associated diseases and disorders. Ann Clin Lab Sci 2012;42:320–37.

33. Unger RH. Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Diabetes 1995;44:863–70.

34. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. Diabetes 2002;51:7–18.

35. Ye J. Mechanisms of insulin resistance in obesity. Front Med 2013;7:14–24.

36. López-Soldado I, Munilla MA, Herrera E. Long-term consequences of under-nutrition during suckling on glucose tolerance and lipoprotein profile in female and male rats. Br J Nutr 2006;96:1030–7.

37. Baxter JD, Dillmann WH, West BL, Huber R, Furlow JD, Fletterick RJ, et al. Selective modulation of thyroid hormone receptor action. J Steroid Biochem Mol Biol 2001;76:31–42.

38. Ness GC. Thyroid hormone. Basis for its hypocholesterolemic effect. J Fla Med Assoc 1991;78:383–5.

39. Duntas LH. Thyroid disease and lipids. Thyroid 2002;12:287–93.

40. Gill JM, Herd SL, Tsetsonis NV, Hardman AE. Are the reductions in triacylglycerol and insulin levels after exercise related? Clin Sci (Lond) 2002;102:223–31.

41. Harrison M, Moyna NM, Zderic TW, O'Gorman DJ, McCaffrey N, Carson BP, et al. Lipoprotein particle distribution and skeletal muscle lipoprotein lipase activity after acute exercise. Lipids Health Dis 2012;11:64.

42. Hassing HC, Surendran RP, Mooij HL, Stroes ES, Nieuwdorp M, Dallinga-Thie GM. Pathophysiology of hypertriglyceridemia. Biochim Biophys Acta 2012;1821:826–32.

43. Bassett DR, Craig BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. J Appl Physiol 1988;64:1249–56.

44. Fuente-Martín E, Granado M, García-Cáceres C, Sanchez-Garrido MA, Frago LM, Tena-Sempere M, et al. Early nutritional changes induce sexually dimorphic long-term effects on body weight gain and the response to sucrose intake in adult rats. Metabolism 2012;61:812–22.

45. Barker DJP, Osmond C, Forsen TJ, Kajantie E, Eriksson JG. Maternal and social origins of hypertension. Hypertension 2007;50:56–71.

46. de Oliveira Leal V, Mafra D. Adipokines in obesity. Clin Chim Acta 2013;419:87–94.

47. Woods LL, Ingelfinger JR, Nyengaard JR, Rasch R. Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats. Pediatr Res 2001;49:460–7.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 – Offspring body weight from birth until adulthood.

The data are reported as the mean ± SE. The numbers in parentheses indicate the number of animals. GU (unchanged litter size), G8 (four males and four females) and G4 (two males and two females). * $p<0.05$ GU vs. G8; # $p<0.05$ G8 vs. G4; & $p<0.05$ GU vs. G4.

Figure 2: Glucose level, insulin level and HOMA index in the 12-week-old offspring.

The data are reported as the mean ± SE. The numbers in parentheses indicate the number of animals. GU (unchanged litter size), G8 (four males and four females) and G4 (two males and two females). * $p<0.05$ vs. G8; # $p<0.05$ vs. GU.

Figure 3: Body weight, adiposity index, food consumption and brown adipose tissue mass in 12-week-old male and female offspring. The data are reported as the mean ± SE. The numbers in parentheses indicate the number of animals. GU (unchanged litter size), G8 (four males and four females) and G4 (two males and two females). * $p<0.05$ vs. G8 and GU.

Table 1 – Body weight, blood pressure, water consumption and food consumption from before pregnancy until delivery in the maternal group.

Weeks	8	9	10	11	12	13	14	15
Body weight (g)	**217.5 ± 10.8 (8)**	**240.3 ± 8.4 (9)**	**263.8 ± 7.5 (9)**	**276.3 ± 6.8 (9)**	**278.5 ± 9 (11)**	**305.5 ± 9.1 (11)**	**342.9 ± 12.7 (11)**	**383.9 ± 17.6 (11)**
Blood pressure (mmHg)				**109.4 ± 6.3 (10)**	**103 ± 6.4 (9)**	**102.5 ± 8.9 (5)**	**111.5 ± 6.6 (7)**	**88.6 ± 10.5 (4)**
Water consumption (ml/week/rat)				**156.8 ± 6.9 (10)**		**215.3 ± 32.6 (6)**	**245.4 ± 37.8 (7)**	**205.3 ± 10.9 (5)**
Food consumption (g/week/rat)				**107.9 ± 4.7[&] (10)**		**146.8 ± 12.3* (8)**	**143 ± 9.5 (7)**	**156.6 ± 20.7* (5)**

The data are reported as the mean ± SE. The numbers in parentheses indicate the number of animals. GU (unchanged litter size), G8 (four males and four females) and G4 (two males and two females). * p<0.05 vs. &

Table 2 – Body weight (g) of the maternal group during the lactation period.

Weeks	**16**	**17**	**18**
GU	**328.6 ± 18.8 (3)**	321.3 ± 9.5 (4)	315.9 ± 14.9 (4)
G8	381.1 ± 42.9 (4)	353.8 ± 32 (4)	325.8 ± 24.3 (4)
G4	329.5 ± 20.7 (3)	343.7 ± 24,7 (3)	349.1 ± 19.8 (3)

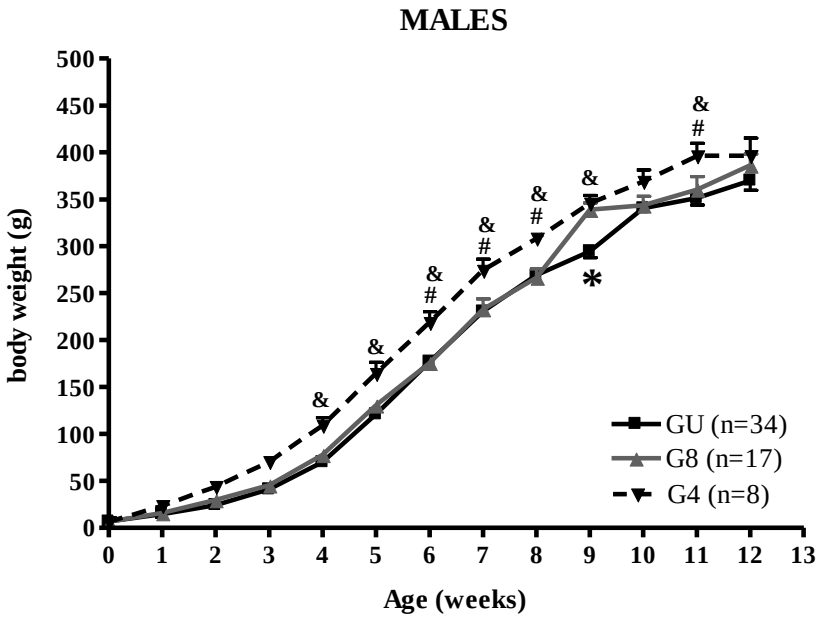
The data are reported as the mean ± SE. The numbers in parentheses indicate the number of animals.

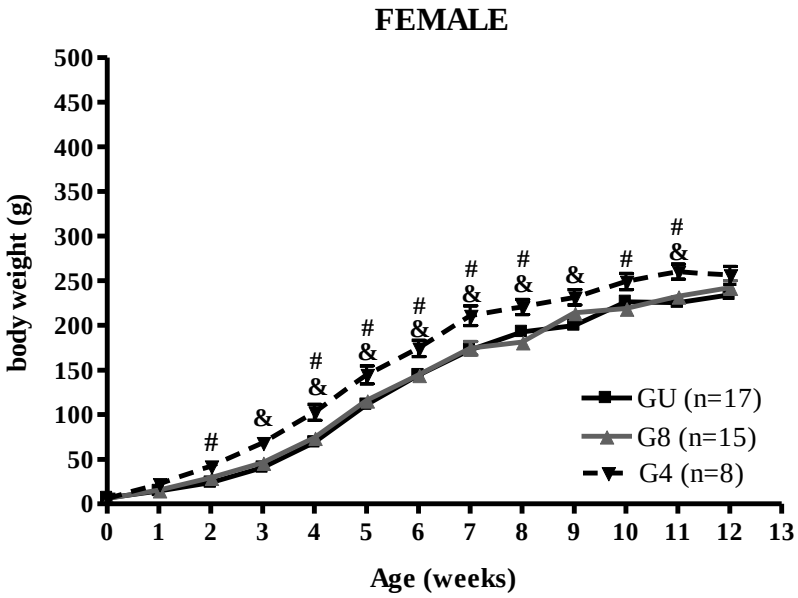
GU (unchanged litter size), G8 (four males and four females) and G4 (two males and two females).

Table 3 – Blood pressure, cholesterol level, triacylglycerol level, renal mass and cardiac mass in the offspring groups at 12 weeks of age.

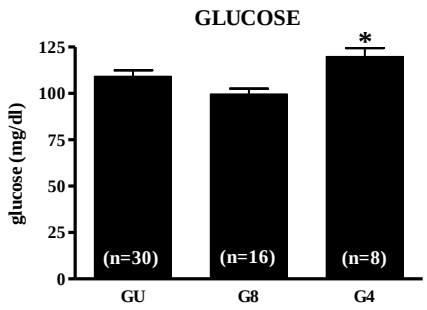
	MALES			**FEMALES**		
	GU	**G8**	**G4**	**GU**	**G8**	**G4**
Blood pressure (mmHg)	126.7 ± 4.3 (21) *	100.6 ± 5.7 (17)	121.4 ± 12.2 (8)	125.5 ± 7.3 (12) *	99.5 ± 5.6 (15)	106.2 ± 7.7 (8)
Cholesterol (mg/dl)	80.6 ± 3.5 (19) *	66.0 ± 2.8 (15)	69.4 ± 5.3 (8)	57.2 ± 3.1 (8)	61.6 ± 3.7 (12)	65.7 ± 4.9 (7)
Triacylglycerol (mg/dl)	49.6 ±4.18 (22) *	67 ± 5.5 (16)	67.3 ± 4.1 (8)	45.7 ± 5.4 (11)	63.5 ± 5.4 (13)	65.3 ± 6.7 (8)
Renal mass (g/100 g of body weight)	0.347 ± 0.005 (32)	0.345 ± 0.005 (17)	0.326 ± 0.01 (6)	0.330 ± 0.005 (17)	0.339 ± 0.005 (14)	0.322 ± 0.006 (6)
Left ventricles (g/100 g of body weight)	0.226 ± 0.004 (32)	0.228 ± 0.004 (17)	0.220 ± 0.009 (6)	0.237 ± 0.004 (17)	0.235 ± 0.003 (15)	0.240 ± 0.016 (6)

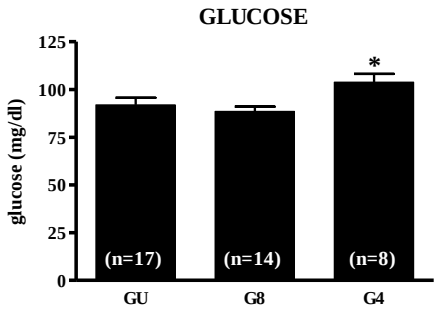
The data are reported as the mean ± SE. The numbers in parentheses indicate the number of animals. GU (unchanged litter size), G8 (four males and four females) and G4 (two males and two females). * $p<0.05$ vs. G8

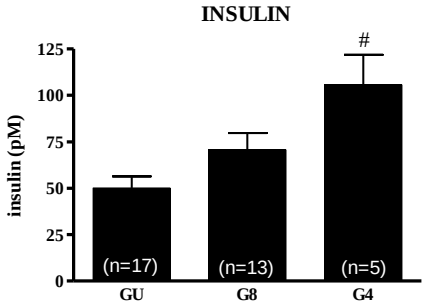

MALES
body weight (g)
Age (weeks)
GU (n=34)
G8 (n=17)
G4 (n=8)

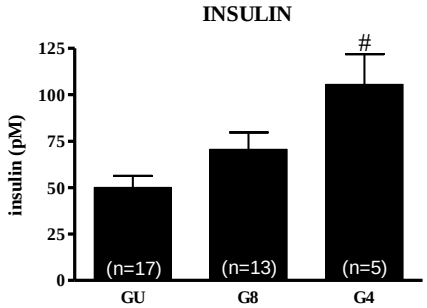

FEMALE
body weight (g)
Age (weeks)
GU (n=17)
G8 (n=15)
G4 (n=8)

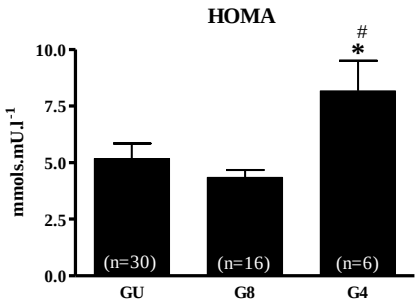
MALES **FEMALE**

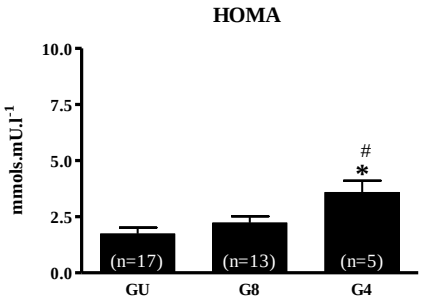




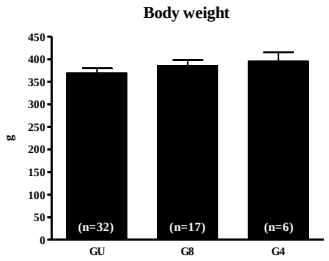


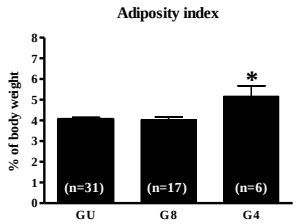


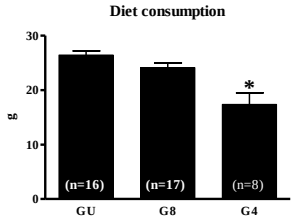


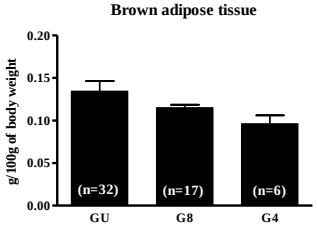
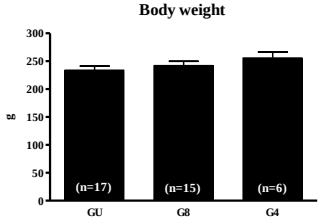
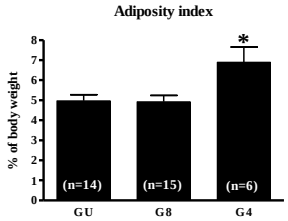
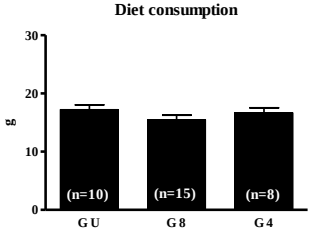
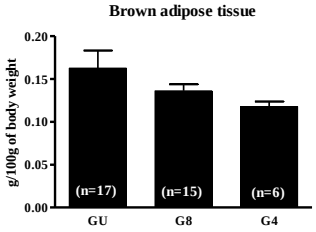


MALES









FEMALES