



Giovana Pereira de Oliveira

**Efeitos da leptina na ingestão alimentar de
descendentes de ratas com alterações
metabólicas e nutricionais**

**Leptin effects on food intake of offspring
from dams with metabolic and nutritional
impairments**

São Paulo

2021

Giovana Pereira de Oliveira

**Efeitos da leptina na ingestão alimentar de
descendentes de ratas com alterações metabólicas e
nutricionais**

**Leptin effects on food intake of offspring from dams
with metabolic and nutritional impairments**

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo, para a
obtenção de Título de Mestre em
Ciências, na Área de Fisiologia
Geral.

Orientadora: Profa. Dra. Ana
Carolina Inhasz Kiss

São Paulo

2021

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca do Instituto de Biociências da USP, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a) no formulário:

'<https://biblioteca.ib.usp.br/ficha-catalografica/src/ficha.php>'

Oliveira, Giovana Pereira de Efeitos da leptina na ingestão alimentar de descendentes de ratas com alterações metabólicas e nutricionais / Giovana Pereira de Oliveira ; orientador Ana Carolina Inhasz Kiss -- São Paulo, 2021.

65 p.

Dissertação (Mestrado) -- Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. hiperglicemia. 2. leptina. 3. ingestão alimentar. 4. descendente. 5. nutrição inadequada. I. Kiss, Ana Carolina Inhasz, orient. II. Título.

Bibliotecária responsável pela catalogação:
Elisabete da Cruz Neves - CRB - 8/6228

Para as pessoas que eu mais amo nesse mundo: Edmilson, Fátima, Júlia,
Marcela e Miza. Tudo para vocês e por vocês, sempre.

Agradecimentos

Aos meus pais, Edmilson e Fátima, obrigada por terem acreditado e sonhado junto comigo. Sei que quando decidi ingressar na universidade pública foi um baque para vocês, ninguém na nossa família havia feito isso antes e vocês temeram por mim, mas a partir da minha primeira conquista, vocês nunca mais soltaram da minha mão e se prontificam desde então a enfrentar qualquer um que duvide da minha capacidade. A minha jornada vai ser sempre dedicada a vocês, sempre.

À minha irmã, Marcela e a minha sobrinha, Júlia. Má, muito antes de ser minha irmã, você é minha mãe e toda e qualquer conquista minha é sempre pensada em você, obrigada por sempre ter me apoiado, por ter sido colo, amparo e carinho quando tudo parecia desabar, sem você, nada disso seria possível. Jú, espero que você possa se espelhar muito em mim no futuro, quero ser sempre sua maior referência. Amo vocês.

À minha vó, Miza. Vó, no meio desse processo enfrentei o medo de quase te perder, e não pensei duas vezes antes de colocar tudo em segundo plano para dedicar todo o meu tempo a você. Obrigada por tanto.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss. Ana, obrigada por sempre ter acreditado tanto em mim, você é a minha maior inspiração dentro do mundo acadêmico. Dei meus primeiros passos na ciência dentro do seu laboratório e sempre soube onde gostaria de chegar justamente por me espelhar em você. Obrigada por nunca ter duvidado da minha capacidade, por ter me incentivado em todas as vezes que pensei em desistir e por ter me dado amparo em um dos momentos mais difíceis da minha vida, é uma honra ser sua aluna.

À minha colega de mestrado, Alessandra. Alê, obrigada por ter sonhado e conquistado junto comigo, sem você, eu não teria chegado até o final dessa etapa, que em alguns momentos foi extremamente desgastante e exaustiva, você esteve sempre ali para me mostrar que no final valeria a pena, obrigada por ser calma, já que sou sempre furacão, você é e sempre será minha metade científica, foi uma honra dividir a bancada do laboratório com você. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Aos meus colegas do Laboratório de Reprodução e Metabolismo (LabReM), Gustavo, Jéssica e Larissa, obrigada por terem me dado tanto suporte e por terem trilhado essa jornada junto comigo, ter realizado o experimento no meio de uma pandemia não foi nada fácil, mas por sorte pude contar com pessoas tão incríveis e dedicadas. Um agradecimento especial à Marina. Má, obrigada por ter cedido tanto do seu tempo para fazer com que eu me tornasse uma cientista melhor, por ter acreditado tanto no meu potencial, por ter lido e relido meu texto inúmeras vezes, por ter compartilhado comigo tanto conhecimento, se um dia eu for metade da cientista que você é, estarei completamente feliz.

Aos meus amigos mais próximos: Alan Silva, Amadeo Beccari, Ana Carolina Fioretto, Ana Paula Martins, Fernanda Silva, Gustavo Cabral, Isabella Velloso, Juliana Pinheiro, Larissa Rodrigues, Laura Miquelin, Lucas Braga, Maycon Tavares, Nathalia Lara, Vinícius Rodrigues, Vitória Badial e Vitor Alcólea, vocês são e sempre serão meu porto seguro.

À Isabella Velloso. Bella, começamos a sonhar com ciência tão cedo né? Esse sonho se iniciou em 2012, muito antes de ingressarmos na UNESP, e eu não sei como seria se eu não tivesse tido você para sonhar junto comigo,

a minha garota de exatas. Você foi e sempre será a minha melhor amizade, a minha pessoa, como eu sempre digo. Obrigada por tornar o processo de estudar sempre tão prazeroso, pelas noites que viramos, pelos brigadeiros, pelas inúmeras provas da VUNESP que fizemos juntas, por ser o meu lugar preferido no mundo. Amo você.

Ao meu grupo preferido: ‘Todo mundo se vestido’: Carolina, você foi minha primeira amiga dentro do mundo acadêmico, estudamos juntas, rimos juntas, sonhamos desde cedo com a nossa vida de cientista, obrigada por tanto, e por ter ficado na rua comigo até tarde inúmeras vezes esperando meu ônibus chegar. Gustavo, obrigada por ter aprendido a demonstrar sentimentos no meio de todos esses anos e por ter me permitido estar tão próxima de você, pelos livros emprestados, pelas conversas, pelas risadas e por sempre ser a pessoa que me faz gargalhar quando tudo está péssimo. Larissa, obrigada por ter feito parte dessa jornada, pelas inúmeras vezes que você foi para o laboratório comigo, por sempre ter cuidado tão bem de mim, cedendo muito do seu tempo, do seu ouvido, do seu colo e da sua casa, pelos silêncios confortáveis e por ser uma senhora de 80 anos junto comigo. Amo vocês.

Ao Leandro. Lê, quando você entrou na minha vida eu já estava no fim dessa trajetória, você me encontrou no momento mais caótico, onde eu só sabia pensar e falar dessa dissertação, obrigada por ter me oferecido tanta calma e tanto amor. Se você cuidou e gostou de mim no momento turbulento, agora vai ficar mais fácil. Obrigada por tanto.

Ao Rafael Tiburcio. Rafa, no meio da minha trajetória você me deixou aqui na terra e eu tive que lidar com um buraco gigante no meu peito, mas quero

que saiba que sua amiga ‘nerd’ queria muito que você estivesse aqui para comemorar essa conquista. Te amo, para sempre.

Ao Rafael Miranda. Rafa, obrigada por ter se debruçado nas minhas planilhas comigo tantas vezes e por ter me ensinado tantas fórmulas e formas de tornar meu trabalho cada vez mais fácil, graças a você sou quase uma ‘expert’ em Excel. Você é meu programador preferido.

Ao Maycon e ao Vinícius. Trabalhar no mesmo ambiente que vocês, foi a melhor coisa que pôde acontecer na minha vida. Maycon, você virou um irmão para mim no meio disso tudo e acho que você sabe disso, obrigada por ter me dado tanto suporte, por estar sempre presente, pelos sorvetes, risadas, rodízios de comida japonesa e por ser tão parecido comigo, essa reta final não teria sido a mesma se você não estivesse tão próximo de mim. Vinícius (ou Garboso), obrigada por sempre ter cedido seu tempo para me ajudar, por ter resolvido tanto perrengue meu sem reclamar (às vezes reclamando também), por ter me ajudado na parte prática tantas vezes, afinal, você me acompanha desde a minha IC, eu sempre falei que dedicaria metade da minha trajetória a você e aqui está. Amo vocês.

Às Profas. Dras. Clélia Akiko Hiruma-Lima, Lúcia Regina Machado da Rocha e Silvia Mitiko Nishida pela oportunidade de ter participado do curso de férias Reprodução de A à Z. O curso apareceu na minha vida justamente quando eu tinha esquecido o meu propósito no mundo acadêmico, vocês foram a minha luz no final do túnel. Espero voltar para participar desse curso maravilhoso mais vezes.

À Comissão Julgadora da Dissertação por se dispuserem a contribuir com comentários e avaliações para uma melhor conclusão desse trabalho.

À Comissão Examinadora do Exame de Qualificação: Profas. Dras. Carla de Moraes Machado, Gisele Akemi Oda e Renata Frazão. Gostaria de agradecer por todas as sugestões, elas foram essenciais para conclusão do meu trabalho.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu, por ter possibilitado a realização dos meus experimentos da iniciação científica e do mestrado em suas estruturas.

Também, aos funcionários do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional – Setor Fisiologia pelos serviços administrativos e pelos cuidados com os animais.

Ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós- Graduação em Ciências (Fisiologia Geral).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de Mestrado concedida (Processo 2019/06974-3) e pelo suporte financeiro (Processo 2019/01306-2).

me levanto
sobre o sacrifício
de um milhão de mulheres que vieram antes
e penso
o que é que eu faço
para tornar essa montanha mais alta
para que as mulheres que vierem depois de mim
possam ver além

Rupi Kaur

Resumo

Estudos mostram que descendentes de mães diabéticas apresentam alterações na estrutura e função de sistemas envolvidos na regulação do balanço energético. Além do metabolismo materno, sabe-se que a nutrição materna também pode comprometer esses parâmetros na prole. No entanto, os efeitos da associação de ambos os fatores maternos na ingestão alimentar dos descendentes ainda não foram explorados. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a ingestão alimentar de descendentes machos e fêmeas de ratas com hiperglicemia moderada e nutrição inadequada durante a prenhez e lactação antes e após a infusão central crônica de leptina. Ratas Sprague-Dawley foram acasaladas e, no dia de prenhez (DP) 0, foram divididas aleatoriamente em 2 grupos experimentais: dieta padrão ou dieta padrão + petiscos, compostos por batata chips e solução de sacarose 1,5% com sabor artificial de frutas vermelhas. No DP 7, ambos os grupos experimentais foram subdivididos em mães normoglicêmicas e mães hiperglicêmicas, pela administração de streptozotocina (STZ, 35mg/kg, i.p.). No dia pós-natal (DPN) 75, 2 machos e 2 fêmeas de cada ninhada foram utilizados e cada um recebeu um tratamento diferente (solução salina ou leptina). Assim, os grupos experimentais foram formados de acordo com o metabolismo materno (normoglicêmico ou hiperglicêmico), dieta materna (ração padrão ou ração padrão mais petiscos), sexo (masculino ou feminino) e tratamento (solução salina ou leptina). No DPN 82, os animais foram submetidos à cirurgia de estereotaxia para implantação de uma cânula no ventrículo lateral cerebral anexada a uma bomba osmótica (Alzet® modelo 2001) que liberou solução salina 0,9% ou leptina (1 µg de leptina por dia a uma taxa de 1 µl / hora por 7 dias consecutivos). O peso corporal e a ingestão alimentar foram monitorados diariamente por 7 dias antes e 7 dias após a cirurgia. No DPN 89, os ratos foram mortos e a implantação da cânula foi avaliada. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética local (Protocolo 1134). O agravamento do quadro de hiperglicemia materna pelo consumo de petiscos modificou o padrão de ingestão alimentar dos descendentes. A presença da hiperglicemia materna durante a prenhez aumentou a ingestão alimentar, sendo que esse aumento foi exacerbado nos descendentes de mães com dieta materna inadequada. A infusão central crônica de leptina reduziu a ingestão alimentar e o peso corpóreo dos animais, sendo

que o efeito anorético foi mais acentuado nos descendentes machos. O metabolismo materno alterado acentuou o efeito da leptina na redução na ingestão alimentar, enquanto o padrão de redução no peso corpóreo dos descendentes foi influenciado pela dieta materna. É importante ressaltar que mesmo um modelo experimental com níveis glicêmicos moderados, associado a um modelo com uma discreta alteração nutricional, resultou em alterações na ingestão alimentar dos descendentes, reforçando a importância do controle glicêmico e nutricional das gestantes para prevenir alterações nos descendentes e, com isso, o efeito transgeracional da obesidade e doenças relacionadas.

Palavras-chave: hiperglicemia; leptina; ingestão alimentar; descendente; nutrição inadequada.

Abstract

There is evidence that offspring from diabetic dams show impairments in the structure and function of the main systems involved in the regulation of energy balance. Besides maternal metabolism, maternal nutrition can also compromise these parameters in the offspring. However, the effects of the association of both maternal factors on offspring food intake have not been explored yet. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of chronic central leptin infusion on food intake of male and female offspring of dams with mild hyperglycemia and snack intake during pregnancy and lactation. Sprague-Dawley rats were mated and on pregnancy day (PD) 0 were randomly divided into 2 experimental groups: standard diet or standard diet + snacks, comprised of potato chips and a red fruit-flavored sucrose syrup (1,5%). On PD 7, both experimental groups were then subdivided into normoglycemic dams and dams that were rendered hyperglycemic by streptozotocin administration (STZ, 35mg/kg, i.p.). On postnatal day (PND) 75, 2 males and 2 females from each litter were used and each received a different treatment (saline solution or leptin). Thus, the offspring experimental groups were formed according to maternal metabolism (normoglycemic or hyperglycemic), maternal diet (standard chow or standard chow plus snacks), sex (male or female) and treatment (saline or leptin). On PND 82, animals underwent a stereotaxy surgery for cannula implantation in the lateral cerebral ventricle attached to an osmotic pump (Alzet® model 2001) that released 0.9% saline solution or leptin (1 µg of leptin per day at a rate of 1 µl / hour for 7 consecutive days). Body weight and food intake were monitored daily for 7 days before and 7 days after surgery. On PND 89, rats were killed, and cannula placement was evaluated. All experimental procedures were approved by the local ethics committee (Protocol 1134). Snack intake aggravated the glucose intolerance of hyperglycemic dams and changed the food intake pattern of the offspring. Maternal hyperglycemia during pregnancy increased offspring food intake, and this increase was more pronounced in the offspring of dams fed with snacks. Leptin chronic central infusion reduced offspring food intake and body weight, and the anorectic effect was more pronounced in males. Leptin effects on offspring food intake were modified by maternal metabolism, with offspring from hyperglycemic dams showing a more pronounced reduction on food intake, while effects on body weight

were influenced by maternal diet. It is important to emphasize that even an experimental model of mild hyperglycemia, associated with a model with a slight nutritional change, resulted in changes in the offspring's food intake, reinforcing the importance of glycemic and nutritional control of pregnant women to prevent metabolic changes in the offspring and, with this, the transgenerational effect of obesity and related diseases.

Key words: *hyperglycemia; leptin; food intake; offspring; snack intake.*

Lista de Abreviaturas

- ARC:** Núcleo arqueado do hipotálamo
- AgRP:** Peptídeo relacionado ao agouti
- CART:** Transcrito regulado por anfetamina e cocaína
- C:** Mães normoglicêmicas com dieta padrão
- C+L:** Filhos de mães normoglicêmicas com dieta padrão – Leptina
- C+Sa:** Filhos de mães normoglicêmicas com dieta padrão – Salina
- CP:** Mães normoglicêmicas com dieta padrão + petiscos
- CP+L:** Filhos de mães normoglicêmicas com dieta padrão + petiscos – Leptina
- CP+Sa:** Filhos de mães normoglicêmicas com dieta padrão + petiscos – Salina
- DCV:** Doenças cardiovasculares
- DM:** Diabete *mellitus*
- DMH:** Núcleo dorsomedial do hipotálamo
- DMG:** Diabete *mellitus* gestacional
- HFD:** "High-fat diet"
- ICV:** intracerebroventricular
- LHA:** Área hipotalâmica lateral
- LepRs:** Receptores específicos de leptina
- NPY:** Neuropeptídeo Y
- POMC:** Proopiomelanocortina
- PVN:** Núcleo paraventricular do hipotálamo
- S:** Mães hiperglicêmicas com dieta padrão
- S+L:** Filhos de mães hiperglicêmicas com dieta padrão – Leptina
- S+Sa:** Filhos de mães hiperglicêmicas com dieta padrão – Salina
- SNC:** Sistema nervoso central
- SP:** Mães hiperglicêmicas com dieta padrão + petiscos
- SP+L:** Filhos de mães hiperglicêmicas com dieta padrão + petiscos – Leptina
- SP+Sa:** Filhos de mães hiperglicêmicas com dieta padrão + petiscos – Salina
- STZ:** Streptozotocina
- VMH:** Núcleo ventromedial do hipotálamo

Sumário

Introdução	17
Objetivo.....	27
Materiais e Métodos.....	28
Obtenção dos descendentes de mães hiperglicêmicas que ingeriram petiscos	28
Avaliação da ingestão alimentar dos descendentes antes e após infusão central de leptina	30
Análise estatística.....	32
Resultados	34
Discussão	42
Conclusões	48
Referências Bibliográficas	49
Biografia	62
Certificado do Comitê de Ética.....	64
Solicitação de Alteração de Título.....	65

Introdução

O balanço energético é o estado alcançado pelo organismo quando a ingestão energética é equivalente ao seu gasto (Hill et al., 2013) e tem como componentes básicos a obtenção, o gasto e o armazenamento de energia (Hill et al., 2012).

Dada sua grande importância para sobrevivência, a obtenção de energia e nutrientes depende de um sistema complexo de controle. Os principais componentes desse sistema são sensores, do meio externo e interno, que convém informações sobre a disponibilidade e aparência dos alimentos, sabor e cheiro, e estado nutricional do organismo para o sistema nervoso central (SNC) que, por sua vez, as associa ao estado emocional e às preferências alimentares do indivíduo (Zheng & Berthoud, 2008). A ingestão alimentar é o resultado da integração de informações sensoriais e motoras no SNC, visando ao equilíbrio entre a disponibilidade ambiental e as necessidades internas do organismo (Ren & Tao, 2020; Zheng & Berthoud, 2008). O padrão de ingestão alimentar e a quantidade de calorias ingeridas varia ainda de acordo com o sexo do indivíduo (Klump et al., 2017; Simerly, 2002), sendo que as variações cíclicas características do ciclo reprodutivo feminino interferem nesse controle (Asarian & Geary, 2013).

Em animais homeotérmicos endotérmicos, o gasto energético compreende principalmente a taxa metabólica de repouso (TMR), a síntese de tecidos e o gasto de energia relacionado à execução das atividades do organismo. A TMR corresponde ao metabolismo de um indivíduo que não está em atividade e que suporta a manutenção da temperatura corpórea e o funcionamento dos vários sistemas e processos celulares de um organismo (Boron, Walter F., 2016). A energia não direcionada à manutenção básica do organismo, pode ser utilizada para síntese de tecidos e armazenamento de reservas energéticas (Bear, 2017). As demais atividades do indivíduo, como obtenção do alimento, busca de parceiros sexuais, entre outros, também respondem por grande parte do gasto energético diário (Hill et al., 2012).

Quando o organismo se encontra no estado alimentado, a energia é armazenada de duas principais formas: glicogênio e triacilgliceróis. As reservas de glicogênio são encontradas principalmente no fígado e no músculo esquelético, enquanto as reservas de triacilgliceróis são encontradas no tecido adiposo, na forma de gordura. Durante o

jejum entre as refeições, o glicogênio e os triacilgliceróis são degradados para fornecer ao corpo um suprimento contínuo de nutrientes (Bear, 2017).

Diversos hormônios advindos da periferia do organismo fornecem sinais importantes a respeito dos estoques energéticos para o SNC, como, por exemplo, insulina, leptina e grelina (Air et al., 2002; Belgardt & Brüning, 2010). Alterações no balanço energético levam à flutuação na secreção desses hormônios (Galicía-García et al., 2020), fornecendo informações sobre o estado nutricional a curto e longo prazo, relacionadas ao metabolismo e equilíbrio energético (Air et al., 2002). Portanto, o SNC é responsável pela regulação desse balanço energético, integrando sinais químicos e neurais advindos da periferia do organismo, a respeito dos estoques energéticos, e sinais eferentes, que modulam a ingestão e o gasto de energia (Sandoval et al., 2008).

Esse sistema está em equilíbrio quando as reservas energéticas são restituídas na mesma velocidade em que são utilizadas (Bear, 2017; Hill et al., 2012). Caso a ingestão e o armazenamento de energia excedam sua utilização, a quantidade de gordura corporal aumenta, e tal processo pode ser denominado balanço energético positivo. Entretanto, se a ingestão energética não alcançar as demandas corporais adequadas, ocorre perda do tecido adiposo, processo denominado balanço energético negativo (Boron, Walter F., 2016). O equilíbrio energético é tipicamente retratado de maneira estática, indicando que reduções na ingestão e aumento no gasto energético levariam, automaticamente, ao déficit de energia e, portanto, à perda de peso. Entretanto, essa abordagem é simplista, já que a regulação do balanço energético ocorre de forma mais complexa (Hopkins & Blundell, 2016), e o comprometimento desse sistema pode provocar diversos distúrbios metabólicos, tais como o diabete (Roden & Shulman, 2019).

Hábitos de vida de um indivíduo, como a ingestão excessiva de alimentos, combinada com a falta de exercícios, podem ser as causas de distúrbios no balanço energético (Hill et al., 2012; Reynolds et al., 2015). Por exemplo, o consumo de alimentos densos em calorias, altamente palatáveis e ultraprocessados, que aumentou consideravelmente nos últimos anos, pode desregular o balanço energético, levando ao ganho excessivo de peso (Zeltser, 2018).

Além dos hábitos de vida, o período perinatal de um indivíduo é crucial para o funcionamento adequado dos sistemas de controle do balanço energético (Alfaradhi &

Ozanne, 2011). A teoria das origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD) sugere que exposições intrauterinas a um ambiente alterado por fatores como distúrbios metabólicos e/ou nutricionais, estresse e infecções estão associadas a um risco aumentado de doenças metabólicas na vida adulta (Alfaradhi & Ozanne, 2011; Gawli et al., 2020). Tais influências durante o desenvolvimento perinatal também podem causar mudanças estruturais permanentes nos indivíduos, como em circuitos neurais e periféricos responsáveis pela manutenção do balanço energético (Zeltser, 2018). Estudos epidemiológicos indicam que a exposição intrauterina a condições metabólicas adversas, como uma nutrição materna inadequada ou distúrbios metabólicos, como o diabetes *mellitus* gestacional (DMG), podem levar a perturbações na regulação do equilíbrio energético do descendente (Agarwal et al., 2018; Spencer, 2012; Taylor & Poston, 2005; Zeltser, 2018).

Dentre os principais distúrbios metabólicos do período perinatal, podemos citar o diabetes, caracterizado por um quadro de hiperglicemia, seja porque a quantidade de insulina produzida é insuficiente ou porque o organismo não responde adequadamente a esse hormônio (Edgerton et al., 2017). De acordo com a Associação Americana de Diabetes (ADA), o diabetes *mellitus* (DM) pode ser classificado em diferentes categorias e, dentre os diversos tipos descritos na literatura, se destacam o DM tipo 1 (DM1), DM tipo 2 (DM2) e o DMG. O DM1 ocorre devido à destruição das células beta pancreáticas, geralmente levando à deficiência absoluta de insulina. Já o DM2 ocorre, principalmente, devido à resistência à insulina dos tecidos muscular e adiposo, podendo também ocasionar uma redução progressiva de sua secreção (ADA, 2018). Durante a gestação, o diabetes pode estar presente de duas formas: como diabetes clínico, em gestantes já diagnosticadas com DM1 ou 2 antes da gestação, ou DMG, que se manifesta somente durante a gestação e é diagnosticado no segundo ou terceiro trimestre da gravidez (ADA, 2018).

A etiologia do DMG está relacionada a uma alteração patológica de mudanças fisiológicas que ocorrem no organismo materno durante a gestação para atender às demandas energéticas do feto em crescimento. No início da gestação, a sensibilidade à insulina aumenta, promovendo a captação de glicose pelo tecido adiposo e, assim, preparando o organismo para as demandas energéticas da gestação (Cianni et al., 2003). No entanto, à medida em que a gravidez avança, a elevação no nível de hormônios sistêmicos e placentários, como estrógeno, progesterona, leptina, cortisol, lactogênio

placentário e hormônio de crescimento placentário, promovem um estado de resistência à insulina (Catalano et al., 1991). Como resultado, a glicemia é levemente elevada, e a glicose é prontamente transportada através da placenta para favorecer o crescimento fetal. Porém, em algumas gestantes, essa resistência à insulina é exacerbada, levando à elevação da glicemia e resultando no DMG (Plows et al., 2018).

Embora o DMG comumente se resolva com o parto, ele pode ter consequências duradouras tanto para a saúde materna, como maior risco de desenvolver DM2, doenças cardiovasculares (DCV) e obesidade (Alfaradhi & Ozanne, 2011), quanto para a saúde do descendente, acarretando impactos a curto e longo prazo. Devido ao quadro de hiperglicemia materna, a glicose atravessa livremente a placenta e induz o pâncreas fetal a produzir insulina em excesso. A combinação de hiperinsulinemia fetal e hiperglicemia materna leva ao aumento dos estoques de gordura e proteína fetal, que podem causar macrossomia ao nascimento (Muhlhausler et al., 2015). A produção em excesso de insulina fetal também pode alterar a função das células beta pancreáticas em desenvolvimento (Fetita, 2014). A longo prazo, os descendentes de mães com DMG têm maior risco de desenvolver obesidade, DM2, DCV e síndromes metabólicas associadas, o que contribui para um ciclo transgeracional vicioso de obesidade e diabetes que afeta a saúde da população como um todo (Plows et al., 2018).

Com o objetivo de melhorar a compreensão do impacto do DMG nas mães e seus descendentes, diversos modelos animais foram desenvolvidos (Kiss, 2009). Para induzir hiperglicemia em roedores, são utilizados agentes beta-citotóxicos, como a streptozotocina (STZ). De acordo com a dose, via ou linhagem animal utilizada, a administração de STZ pode resultar em quadros de hiperglicemia grave ou moderada nos animais (Kiss, 2009). A hiperglicemia característica do quadro de DMG pode ser reproduzida em roedores pela administração de STZ durante a prenhez (Gelardi, 1988), sendo que, na vida adulta, os animais apresentam glicemia entre 120 e 300 mg/dL, caracterizando um quadro de hiperglicemia moderada (Kiss, 2009). A hiperglicemia moderada observada nesse modelo experimental se correlaciona melhor ao quadro hiperglicêmico que acomete mulheres com DMG e, portanto, pode facilitar a translação dos achados experimentais à clínica (Jawerbaum & White, 2017).

Entretanto, nem todos os efeitos do diabetes em gestantes são replicados em modelos animais. A presença de macrossomia, por exemplo, é uma alteração comum em recém-nascidos de mulheres com diabetes gestacional (Muhlhausler et al., 2015).

No entanto, os estudos experimentais divergem, com alguns obtendo um quadro semelhante aos estudos clínicos (Merzouk, H., 2000, 2001; Merzouk, Hafida, 2002), e outros nos quais não há aumento expressivo de recém-nascidos grandes para a idade de prenhez (Kervran et al., 1978; Kiss, 2012). Esses achados evidenciam a relevância do estudo de modelos experimentais de diabetes no período gestacional, para conhecer os pontos de semelhança e divergência com os achados da clínica, além de possibilitar a melhor compreensão dos seus impactos sobre a prole e possíveis translações para a população humana.

O diabetes materno também pode alterar a ingestão alimentar dos descendentes (Steculorum & Bouret, 2011b). Plagemann (Andreas Plagemann, 2004) coloca que, quando hormônios como leptina e insulina estão presentes em concentrações não fisiológicas durante períodos críticos do desenvolvimento, eles podem causar alterações no desenvolvimento hipotalâmico do descendente. Sabe-se que o diabetes gestacional altera o desenvolvimento de circuitos hipotalâmicos que controlam a ingestão alimentar, afetando não apenas o número de neurônios hipotalâmicos dos descendentes, mas também a densidade das projeções neurais envolvidas na regulação da ingestão alimentar, podendo levar a hiperfagia (Garcia-Vargas et al., 2012; Steculorum & Bouret, 2011b).

A presença de hiperglicemia grave durante a prenhez pode aumentar a expressão de neuropeptídeo Y (NPY) e peptídeo relacionado à agouti (AgRP) no hipotálamo dos descendentes e, com isso, contribuir para a hiperfagia (Franke et al., 2005). Outros estudos mostram que descendentes de mães hiperglicêmicas apresentam alterações na densidade de neurônios AgRP e aumento do número de neurônios que produzem proopiomelanocortina (POMC) (Steculorum & Bouret, 2011b), mostrando que a presença de hiperglicemia materna pode alterar permanentemente os sistemas neurais responsáveis pela ingestão alimentar.

Além das alterações metabólicas maternas, a nutrição inadequada durante a gestação também pode agravar as consequências a longo prazo para a saúde do indivíduo. Durante esse período crítico de desenvolvimento, tanto desnutrição quanto supernutrição materna podem causar alterações permanentes no organismo do descendente (Barnes & Ozanne, 2011). A desnutrição materna pode levar à restrição do crescimento intrauterino e, portanto, baixo peso ao nascimento, que também está associado ao desenvolvimento de doenças metabólicas na vida adulta, como o DM2

(Hales & Barker, 2013). No entanto, nos últimos anos, os estudos têm se voltado cada vez mais para o estudo do impacto da exposição ao excesso de nutrientes durante a gestação e lactação (Muhlhausler, Beverly S., 2013).

Apesar de haver um aumento na demanda energética durante a gestação, as gestantes devem consumir uma dieta balanceada, sendo que o aumento na ingestão alimentar não deve estar 10% acima da ingestão energética recomendada para mulheres não grávidas (Koletzko et al., 2019). No entanto, é comum que a alimentação de mulheres em idade reprodutiva inclua uma alta quantidade de "junk food", ou seja, alimentos com alta densidade energética, mas pobres em nutrientes, além do consumo de carnes processadas, "fast foods" e refrigerantes. Tais comportamentos alimentares podem contribuir para o sobrepeso e obesidade e são prejudiciais para o organismo materno e desenvolvimento fetal (Wen et al., 2009).

Além dos problemas estruturais que podem ser causados por conta do diabetes materno, estudos experimentais mostram que animais nascidos de mães que tiveram acesso a uma dieta rica em açúcar ou gordura também apresentam alterações nas vias hipotalâmicas responsáveis pela ingestão alimentar (Kirk et al., 2009). A exposição fetal à um suprimento calórico elevado, seja de glicose ou gordura, durante janelas críticas de desenvolvimento, resulta em alterações permanentes na estrutura e função dos principais sistemas envolvidos na regulação do balanço energético e da ingestão alimentar (Armitage et al., 2004; Mcmillen et al., 2008; Muhlhausler, B., & Smith, 2009; Muhlhausler, Beverly S., 2013). A supernutrição durante o período fetal pode levar ao crescimento fetal anormal, alterações na adipogênese (Mahizir et al., 2016), hiperinsulinemia e hiperleptinemia perinatal (Plagemann, A. 2011), promovendo também alterações nas vias centrais de controle da ingestão alimentar dos descendentes, resultando em aumento do apetite, da ingestão energética e adiposidade (Ezgi & Kabaran, 2019). Nesse contexto, os modelos animais desempenham um papel fundamental para que sejam esclarecidos os efeitos de alterações nutricionais maternas, identificando janelas críticas de desenvolvimento, com o intuito de desenvolver estratégias de prevenção através de intervenções nutricionais para mães e seus descendentes (Hsu, C. N., & Tain, 2019).

Dentre os diversos modelos animais de supernutrição descritos, o modelo de "high-fat diet" (HFD), com 30-85% das calorias derivadas da gordura, é o mais utilizado (Pinheiro-Castro et al., 2019). Existem diferenças marcantes na composição

das HFD utilizadas, sendo que a quantidade de micro e macronutrientes pode variar, assim como a de gorduras saturadas, o que resulta numa variabilidade significativa entre os estudos. Portanto, o resultado fenotípico de uma prole de mães expostas a HFD durante a prenhez varia com base na composição, tempo e duração do consumo da dieta (Islam & Wilson, 2012; Stott & Marino, 2020).

Por exemplo, descendentes de mães que consomem HFD podem nascer pequenos ou grandes para a idade de prenhez (Jones et al., 2009; Mark et al., 2011), sendo que ambas as condições podem desencadear distúrbios metabólicos na vida adulta. Evidências indicam que a exposição materna a HFD durante o período de prenhez ou lactação também pode desencadear distúrbios metabólicos na prole a longo prazo, como obesidade, intolerância à glicose, resistência à insulina, aumento da adiposidade e dos níveis séricos de triglicerídeos (Armitage et al., 2004; Ashino et al., 2012; Lemes et al., 2018; Mathias et al., 2014; Lyda Williams et al., 2014). Além disso, condições maternas associadas, como o diabetes, podem agravar o fenótipo observado na prole (L. Williams et al., 2014).

Além da HFD, existem outros modelos de dietas hipercalóricas, tais como a dieta de cafeteria e dietas “junk food”. A dieta de cafeteria consiste no oferecimento de uma seleção de alimentos com alta densidade energética e alto teor de gordura e açúcar, que são regularmente consumidos na população humana, como bolos, biscoitos, batatas fritas e carnes processadas. Esse modelo tem grande relevância, por refletir os hábitos alimentares da sociedade ocidental (Small et al., 2018; Lyda Williams et al., 2014; Zeeni et al., 2015). Os descendentes de ratas que consomem uma dieta de cafeteria normalmente são hiperfágicos, resistentes à insulina, hipertensos e intolerantes à glicose na vida adulta (Nivoit et al., 2009; A. Samuelsson et al., 2015). Já o consumo materno de dietas “junk food”, ou seja, alimentos com alta densidade energética e palatabilidade, leva ao aumento do peso dos descendentes pós-desmame, com efeitos similares ao da dieta de cafeteria, como hiperfagia (Bayol et al., 2007). Em modelos experimentais, a exposição a dietas com alto teor de gordura ou dietas de cafeteria resulta em efeitos deletérios para a prole, incluindo hiperfagia, aumento da adiposidade corporal, níveis elevados de triglicerídeos, hiperglicemia e resistência à insulina (Ainge et al., 2011; Sampey et al., 2009; Tsan et al., 2021).

Na mesma linha do modelo de dieta de cafeteria, o modelo de petiscos tem chamado atenção atualmente (Hoch et al., 2014), tendo em vista que a ingestão de

petiscos aumentou nas últimas décadas (Slining et al., 2013) e esse modelo mimetiza o hábito da população humana de ingerir alimentos ou bebidas de alta densidade calórica além das refeições regulares (Hess et al., 2016).

Os petiscos têm um fraco efeito sobre a saciedade e, na população humana, não resultam na redução compensatória da ingestão calórica em refeições regulares (Chapelot, 2011; Whybrow et al., 2007). Seu consumo normalmente se refere a alimentos ricos em energia e pobres em nutrientes, com alto teor de sódio, açúcar e/ou gordura (Bellisle, 2014; O'Connor et al., 2015), e que são responsáveis por aumentar a ingestão total de energia (Slining et al., 2013). O consumo de petiscos pode desencadear uma ingestão alimentar hedônica, ou seja, o comer na ausência de fome, o que pode anular o balanço energético homeostático, e, portanto, levar à hiperfagia, a ingestão alimentar além da saciedade (Hans-Rudolf Berthoud, 2011).

Estudos do nosso grupo de pesquisa mostram que ratas hiperglicêmicas que consomem petiscos durante a prenhez e lactação apresentam agravamento do quadro de intolerância à glicose (Martins et al., 2021a). Descendentes de mães que receberam petiscos têm menor quantidade de gordura visceral e peso ao nascer e no desmame, mas não apresentam diferenças no peso corpóreo durante a adolescência, apresentando, portanto, um fenômeno conhecido como “catch-up growth” (Ong et al., 2000). Outras alterações são observadas, tais como, redução no comportamento de ansiedade da prole feminina, alterações na função reprodutiva da prole masculina e menor preferência à sacarose (Martins et al., 2021a). No entanto, os efeitos no balanço energético e na ingestão alimentar dos descendentes ainda não foram investigados nesse modelo experimental.

O balanço energético é controlado principalmente pelo hipotálamo, uma região do SNC que está intimamente associada à regulação de funções básicas como reprodução, temperatura, regulação hormonal e ritmos biológicos (Wilson & Enriori, 2015). Em particular, o núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) é crítico para regulação da alimentação e do metabolismo (Myers & Olson, 2012; Timper & Brüning, 2017), sendo que a regulação da homeostase energética envolve uma rede neural interconectada que contém neurônios especializados localizados no ARC, no núcleo ventromedial (VMH), núcleo dorsomedial (DMH), núcleo paraventricular (PVN) e na área hipotalâmica lateral (LHA) (Bouret, 2017).

Existem dois tipos de populações neuronais no ARC responsáveis pela integração de sinais metabólicos hormonais e nutricionais da periferia do organismo. A população neuronal orexígena, responsável pela estimulação da ingestão alimentar, é composta por neurônios que sintetizam NPY e AgRP, enquanto a população neuronal anorexígena, responsável pela diminuição da ingestão alimentar, é representada por neurônios produtores de POMC e o transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART) (Timper & Brüning, 2017).

Esses neurônios recebem sinais da periferia do organismo através de diversos hormônios, como a leptina. A leptina é produzida principalmente no tecido adiposo, mas também pode ser sintetizada em uma variedade de tecidos, incluindo placenta, glândula mamária, ovário, músculo esquelético, estômago e tecido linfóide (Margetic et al., 2002; Park, H. K., & Ahima, 2014). Seus níveis circulantes estão correlacionados à quantidade de gordura corporal do organismo, refletindo o estado dos estoques energéticos de longo prazo, que podem variar de acordo com mudanças na ingestão calórica (Chan et al., 2003; Park, H. K., & Ahima, 2014).

Os efeitos da leptina podem ser exercidos por meio de sua ligação a receptores específicos (LepRs) localizados por todo o SNC, levando à inibição da ingestão alimentar e, portanto, regulando o peso corpóreo e a homeostase energética (Ahima & Osei, 2004). No ARC, a leptina interage com um circuito neural complexo para controlar a ingestão alimentar, ativando populações neuronais anorexígenas (POMC e CART) e inibindo populações orexígenas (AgRP e NPY) (Park, H. K., & Ahima, 2014). A queda nos níveis plasmáticos de leptina estimula a expressão de AgRP e NPY e suprime a de POMC e CART, aumentando, assim, a ingestão alimentar e diminuindo o gasto energético (Cowley et al., 2001). Quando roedores são tratados com leptina, tanto a administração intracerebroventricular (ICV) quanto intraperitoneal reduzem a ingestão alimentar (Clegg et al., 2003; Kanoski et al., 2011; Riedman, 1997; Seeley, R. J., 1996; Wetzler et al., 2005). Descendentes de mães hiperglicêmicas (Ortega-Senovilla et al., 2011) e com acesso a diversos tipos de dietas, como cafeteria, HFD e outras, apresentam alterações nos níveis de leptina (Glavas et al., 2010). No entanto, não se sabe se essas alterações podem modificar o controle da ingestão alimentar em um modelo experimental no qual ambos os fatores maternos estão presentes.

Apesar de vários estudos mostrarem o impacto do diabetes materno e da dieta materna inadequada para os descendentes em uma série de parâmetros, os efeitos da

combinação de ambos no controle da ingestão alimentar dos descendentes ainda não foram explorados. Como já colocado anteriormente, evidências mostram que tanto a hiperglicemia quanto a nutrição materna inadequada podem levar a alterações nos circuitos neurais responsáveis pela ingestão alimentar dos descendentes (Gawli et al., 2020), e essa alteração pode estar diretamente relacionada à maior incidência de obesidade e doenças metabólicas na prole (Dearden & Ozanne, 2015). Além disso, estudos do nosso grupo de pesquisa mostram que a infusão central crônica de insulina reduz a ingestão alimentar em descendentes de ratas com hiperglicemia moderada de forma mais acentuada que em descendentes de mães normoglicêmicas (Oliveira et al., 2018), sugerindo que a resposta central a outros hormônios, como a leptina, também possa estar alterada.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a ingestão alimentar de descendentes machos e fêmeas de ratas com hiperglicemia moderada e nutrição inadequada durante a prenhez e lactação, antes e após a infusão central crônica de leptina. Nossa hipótese é que o agravamento do quadro de hiperglicemia materna, proporcionado pelo consumo de petiscos, irá modificar o padrão de ingestão alimentar dos descendentes de maneira mais pronunciada do que o observado até o momento nos estudos nos quais os fatores maternos foram estudados de forma isolada. Além disso, esperamos que a infusão central de leptina reduza a ingestão alimentar em todos os animais, mas que essa resposta anorética seja mais acentuada nos descendentes de mães hiperglicêmicas com dieta inadequada, e que machos e fêmeas respondam de maneira distinta.

Objetivo

Avaliar a ingestão alimentar de descendentes machos e fêmeas de ratas com hiperglicemia moderada e nutrição inadequada durante a prenhez e lactação, antes e após a infusão central crônica de leptina.

Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos machos e fêmeas da linhagem Sprague-Dawley mantidos sob condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), umidade ($50 \pm 10\%$), ciclo claro/escuro de 12/12 horas (luzes acesas às 7 horas), e água e ração à vontade. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética local (Protocolo CEUA N° 1134).

O modelo experimental de oferecimento de petiscos, associado ao modelo de indução de hiperglicemia moderada durante a prenhez, foi empregado para estudar a ingestão alimentar de descendentes machos e fêmeas antes e após a infusão central crônica de leptina. Os grupos experimentais foram formados de acordo com a presença ou não da hiperglicemia materna e com o oferecimento ou não de petiscos. Posteriormente, os descendentes de ambos os sexos foram subdivididos em grupos tratados com salina ou leptina.

Obtenção dos descendentes de mães hiperglicêmicas que ingeriram petiscos

Os procedimentos experimentais dessa etapa estão ilustrados na **Figura 1**. Para obtenção dos descendentes, ratas fêmeas adultas ($n=55$) foram acasaladas com machos controle, sendo a presença de espermatozoides no esfregaço vaginal considerada o dia 0 de prenhez (DP 0). No DP 0, as ratas foram aleatoriamente divididas em 2 grupos experimentais: mães com dieta padrão (382,5 kcal/100 g) *ad libitum* ($n=28$) e mães com dieta padrão + petiscos ($n=27$).

O oferecimento de petiscos, composto por batata *chips* (556 kcal/100 g) e solução de sacarose 1,5% com sabor artificial de frutas vermelhas (Bacana®, 44 kcal/100 mL), ocorreu do DP 0 até o dia de lactação (DL) 14 (Martins et al., 2021a). A partir desse momento, os filhotes começam a se alimentar de maneira independente (Woodside et al., 2012), portanto, o oferecimento dos petiscos foi encerrado para garantir que eles não tivessem acesso direto à dieta materna.

A hiperglicemia moderada materna foi induzida durante a prenhez. No DP 7, metade das ratas dos grupos dieta padrão ($n=13$) e dieta padrão + petiscos ($n=13$) receberam uma injeção intraperitoneal de 35 mg/kg de STZ (SIGMA Chemical Company, St. Louis, Millstone), diluído em tampão citrato 0,1 M e pH 4,5, enquanto as demais fêmeas ($n=29$) receberam tampão citrato (0,1 M, pH 4,5) via intraperitoneal,

no mesmo volume e dia de prenhez (adaptado de Gelardi, 1988). Sendo assim, após a administração de STZ, 4 grupos experimentais foram formados: mães normoglicêmicas com dieta padrão (C, n=15), mães normoglicêmicas com dieta padrão + petiscos (CP, n=14), mães hiperglicêmicas com dieta padrão (S, n=13), e mães hiperglicêmicas com dieta padrão + petiscos (SP, n=13).

Apenas ratas prenhes com hiperglicemia moderada (120-300 mg/dL) foram incluídas nos grupos de mães hiperglicêmicas com dieta padrão ou dieta padrão + petiscos. Ratas com glicemia de jejum acima de 300 mg/dL foram excluídas do experimento, já que tal perfil glicêmico se enquadra em um quadro de diabetes grave, que não era o foco do presente estudo. Já foi demonstrado que o oferecimento de petiscos durante a prenhez e lactação agrava o quadro de hiperglicemia materna (Martins et al., 2021a).

Por volta do DP 21, as ratas pariram naturalmente e as ninhadas foram padronizadas para 4 machos e 4 fêmeas no dia pós-natal (DPN) 1, para garantir a uniformidade na alimentação e cuidado dos descendentes. Os filhotes permaneceram com suas mães até o desmame. Para todas as análises realizadas, a ninhada foi a unidade experimental, sendo utilizados 4 descendentes de cada ninhada: 2 fêmeas e 2 machos.

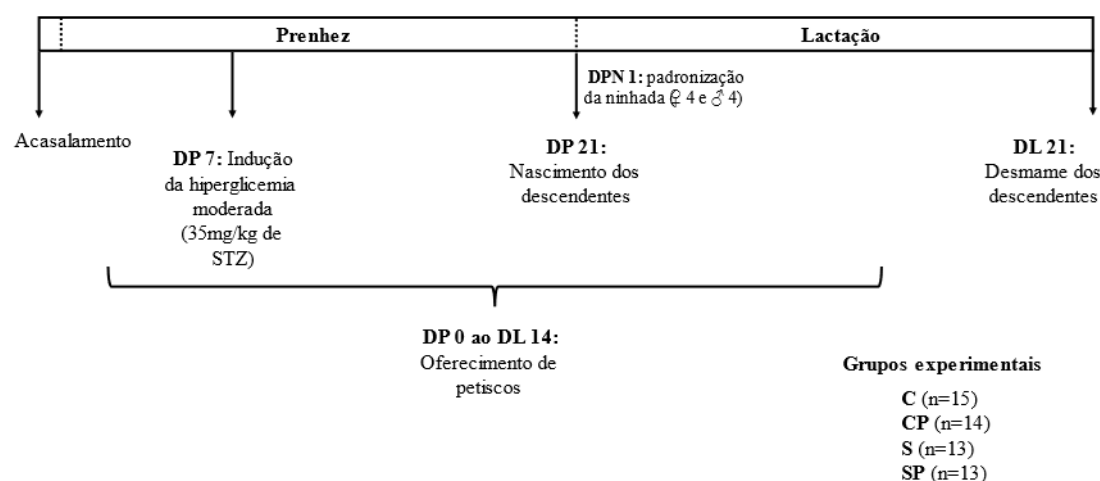


Figura 1: Obtenção dos descendentes. DP = Dia de prenhez; DPN = Dia pós-natal; DL = Dia de lactação; C = Mães normoglicêmicas com dieta padrão; CP = Mães normoglicêmicas com dieta padrão + petiscos; S = Mães hiperglicêmicas com dieta padrão; SP = Mães hiperglicêmicas com dieta padrão + petiscos.

Avaliação da ingestão alimentar dos descendentes antes e após infusão central de leptina

Os procedimentos experimentais dessa etapa estão ilustrados na **Figura 2**. A ingestão alimentar de descendentes machos e fêmeas de mães normoglicêmicas e hiperglicêmicas com acesso ou não a petiscos durante a prenhez e lactação foi avaliada antes e após a infusão central crônica de leptina.

Antes do início dos procedimentos, por volta do DPN 60, todas as descendentes fêmeas foram castradas para evitar influências decorrentes das variações hormonais do ciclo estral nos dados da ingestão alimentar (Asarian & Geary, 2013; Massa, M. G., & Correa, 2020). Diversos ajustes metodológicos são possíveis para contornar as alterações decorrentes do ciclo estral, como o acompanhamento da fase do ciclo em fêmeas intactas ou até mesmo a reposição hormonal controlada de fêmeas castradas. Nosso grupo de pesquisa testou essas alternativas em um estudo prévio, e a metodologia que se mostrou mais efetiva, e que resultou em menor variabilidade no estudo da ingestão alimentar, foi a de castração das fêmeas após a puberdade (Oliveira et al., 2018). Cabe ressaltar que a castração é realizada após a puberdade, momento no qual os circuitos hipotalâmicos já se desenvolveram sob influência dos hormônios reprodutivos circulantes (Massa & Correa, 2020).

Para realização da castração, as ratas foram anestesiadas com isoflurano (Isoforine[®]), com taxa de 4% a 0,7 L por 5 minutos para indução e, posteriormente, manutenção a 2,7% a 0,7 L durante o procedimento cirúrgico. Com a fêmea anestesiada e em decúbito lateral, incisões foram feitas em cada flanco, os ovários foram removidos e as incisões suturadas (Martins et al., 2021a). Após o procedimento cirúrgico, foi administrado anti-inflamatório via intraperitoneal (Meloxinew[®] 3%) para o controle da dor e inflamação no período pós-operatório.

Quando os descendentes (fêmeas e machos) atingiram o DPN 75, foi iniciado o acompanhamento diário da ingestão alimentar e do peso corpóreo por 7 dias consecutivos. Para melhor quantificar o consumo, a ração padrão (382,5 kcal/100 g) foi oferecida na forma de pó para os animais, dentro da caixa-moradia. O recipiente contendo a ração era colocado dentro de outro recipiente maior, permitindo que qualquer perda de ração pudesse ser quantificada. Além do mais, no momento da

pesagem, a ração era peneirada com o intuito de separar a ração de outros materiais, como a maravalha da caixa. O acompanhamento de consumo de ração e do peso corpóreo foi realizado sempre no mesmo horário durante a manhã, se iniciando por volta das 10 h.

Após o término do consumo pré-cirurgia (DPN 82), os animais foram anestesiados por anestesia inalatória, como previamente descrito para a ovariectomia, e passaram por uma cirurgia de estereotaxia para implantação de uma cânula no ventrículo lateral cerebral. Na cirurgia de estereotaxia, foi realizada tricotomia do local, seguida de assepsia com iodo, uma incisão de aproximadamente 3 cm e afastamento da pele com auxílio de pinças hemostáticas. Os demais tecidos foram removidos para visualização das suturas cerebrais, seguido de perfuração do crânio com auxílio de um micromotor de bancada. Após esses procedimentos, uma cânula foi ancorada no crânio por dois parafusos de aço inoxidável e acrílico dental autopolimerizante, e conectada por um tubo de polietileno a uma bomba osmótica (Alzet[®] modelo 2001), inserida via subcutânea (s.c.) na região dorsal do animal. A cânula foi implantada no ventrículo lateral cerebral seguindo as seguintes coordenadas: anteroposterior -0,8; lateral -1,4; e ventral 4,0, sendo o bregma a referência utilizada (Paxinos & Watson, 2007). As bombas osmóticas liberaram salina estéril (NaCl 0,9%) (grupos +Sa) ou leptina diluída em soro bovino fetal 0,1% (leptina murina recombinante, PeproTech[®], Cranbury, NJ, EUA) (grupos +L). As bombas osmóticas liberaram salina ou 1 µg de leptina por dia, a uma taxa de 1 µl/h, durante 7 dias consecutivos (Abizaid et al., 2004). Após a cirurgia, também foi administrado anti-inflamatório via intraperitoneal, como descrito anteriormente. A ingestão alimentar e o peso corpóreo foram registrados diariamente nos 7 dias consecutivos à cirurgia.

Para análise dos dados obtidos, as médias aritméticas referentes aos três últimos dias de consumo alimentar e peso corpóreo pré-cirurgia foram calculadas. Para avaliação do consumo e do peso após infusão de leptina ou salina, foi realizada a subtração do consumo e peso corpóreo em cada dia pós-cirurgia pelo valor da média calculada pré-cirurgia.

No DPN 90, após o acompanhamento do consumo alimentar e peso corpóreo, os animais foram eutanasiados com o intuito de averiguar o posicionamento correto da cânula. Os animais foram novamente anestesiados com anestesia inalatória e decapitados em seguida. A implantação da cânula foi avaliada através da injeção de

corante no tubo de polietileno. Apenas animais que apresentaram implantação correta da cânula foram incluídos nas análises.

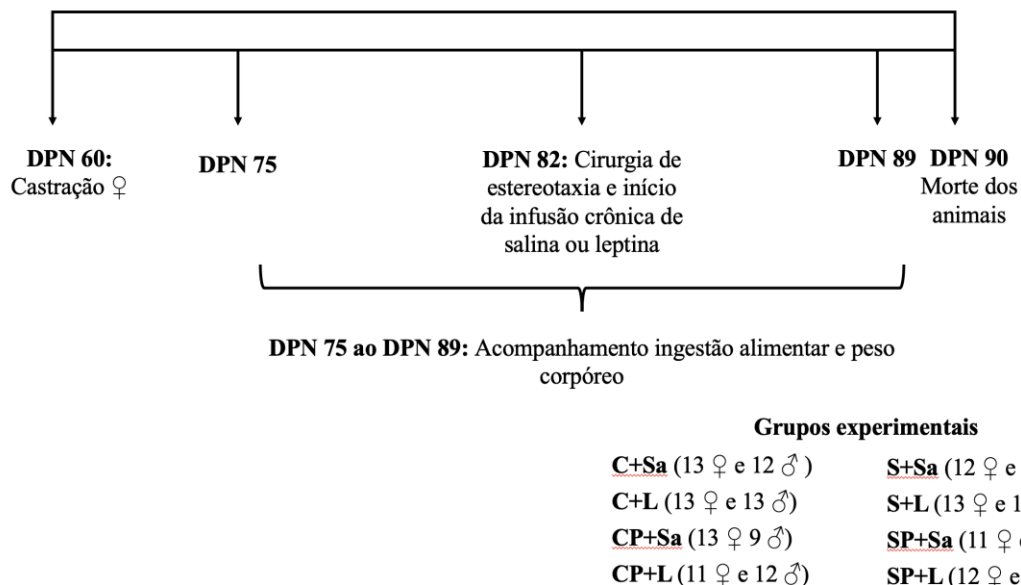


Figura 2: Desenho experimental para avaliação da ingestão alimentar nos descendentes. DPN= Dia pós-natal; C= Filhos de mães normoglicêmicas com dieta padrão; CP= Filhos de mães normoglicêmicas com dieta padrão + petiscos; S= Filhos de mães hiperglicêmicas com dieta padrão; SP= Filhos de mães hiperglicêmicas com dieta padrão + petiscos; +Sa= Salina; +L= Leptina.

Análise estatística

Todos os dados são apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). Para avaliação do consumo alimentar diário e do peso corpóreo, o *z score* dos dados foi calculado para detectar animais *outliers*, sendo que animais com *scores* abaixo de -3 e acima de 3 em um parâmetro foram considerados *outliers* e excluídos da análise de todos os parâmetros. Após exclusão desses animais, o total de animais em cada grupo experimental foi: C+Sa (13 ♀, 12 ♂); C+L (13 ♀, 13 ♂); CP+Sa (13 ♀, 9 ♂); CP+L (11 ♀, 12 ♂); S+Sa (12 ♀, 10 ♂); S+L (13 ♀, 11 ♂); SP+Sa (11 ♀, 9 ♂); SP+L (12 ♀, 11 ♂).

Os dados foram analisados com ANOVA de medida repetida de 5 vias com tempo como medida repetida, e metabolismo materno (mãe normoglicêmica ou hiperglicêmica), dieta materna (dieta padrão ou dieta + petiscos), sexo (macho ou fêmea) e tratamento (salina ou leptina) como fatores. Também foi realizada uma

ANOVA univariada para análise da ingestão alimentar e peso corpóreo médio antes da cirurgia para infusão central crônica de leptina.

Foi estabelecido o limite mínimo de significância de 95% ($p < 0,05$) e os valores de F, p e η (*eta square*) estão descritos para todas as análises. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o *software* JASP.

Resultados

Os dados de ingestão alimentar e peso corpóreo dos descendentes foram coletados para todos os grupos experimentais. Os dados obtidos com o acompanhamento diário da ingestão alimentar nos 3 dias anteriores à cirurgia foram utilizados para o cálculo da média de consumo de ração pré-cirurgia. Esses valores foram comparados entre os grupos para observarmos a existência de diferenças relacionadas a hiperglicemia ou nutrição materna antes do tratamento com leptina. Em seguida, o consumo de ração por 7 dias consecutivos após a implantação de bomba osmótica para infusão crônica central de leptina foi avaliado utilizando como base a média de consumo pré-cirurgia, ou seja, a diferença entre o consumo de ração para cada dia pós-cirurgia e a média pré-cirurgia, para visualizarmos como o tratamento com leptina modificou a ingestão alimentar ao longo do tempo. O mesmo procedimento foi realizado para o peso corpóreo.

Os resultados referentes a esses procedimentos estão detalhados a seguir. Somente diferenças significativas serão descritas e representadas nos gráficos. Sendo assim, de acordo com a presença ou ausência de diferença significativa em determinada análise, os dados podem ser representados de forma colapsada, nos quais dois ou mais grupos experimentais foram agrupados, para melhor interpretação e visualização dos achados do estudo. Dessa forma, mais de um gráfico pode ser apresentado para o mesmo parâmetro, facilitando a visualização dos efeitos significativos encontrados.

No período pré-cirurgia, a análise do consumo médio de ração (Figura 3) mostrou que machos ingeriram mais ração do que fêmeas (Figura 3A). Descendentes de mães hiperglicêmicas ingeriram mais ração do que os de mães normoglicêmicas (Figura 3B), efeito que foi exacerbado quando as mães hiperglicêmicas ingeriram petiscos (Figura 3C). Além disso, como esperado, machos apresentaram peso corpóreo maior do que fêmeas (Figura 3D).

Após a cirurgia, ocorreu uma redução na ingestão alimentar em todos os animais, o que já é esperado. Após a recuperação da cirurgia de estereotaxia, a ingestão alimentar dos descendentes aumentou com o tempo (Figura 4A-F). A ingestão alimentar dos machos foi maior do que a das fêmeas (Figura 4A). Descendentes de mães hiperglicêmicas apresentaram uma tendência a ingerirem mais ração do que os

de mães normoglicêmicas (Figura 4B), sendo que esse efeito foi mais pronunciado nas fêmeas (Figura 4C). Como esperado, o tratamento com leptina reduziu a ingestão alimentar (Figura 4D), especialmente nos machos (Figura 4E). Apesar do tratamento com leptina ter reduzido a ingestão alimentar ao mesmo patamar nos descendentes de mães normoglicêmicas e hiperglicêmicas, como descendentes de mães hiperglicêmicas apresentam um maior consumo de ração, essa redução foi mais exacerbada nesse grupo (Figura 4F).

Com relação ao peso corpóreo diário dos descendentes, de forma geral, houve redução do peso corpóreo dos descendentes após a cirurgia (Figura 5A-G), sendo que machos apresentaram maior peso corpóreo do que as fêmeas, como esperado (Figura 5A). Descendentes de mães hiperglicêmicas apresentaram maior peso corpóreo do que os de mães normoglicêmicas (Figura 5B), com diferença especialmente nas fêmeas (Figura 5C). O tratamento com leptina reduziu o peso corpóreo (Figura 5D), sendo que essa redução foi mais exacerbada em machos (Figura 5E), especialmente nos descendentes de mães normoglicêmicas que ingeriram petiscos (Figura 5F), do que em fêmeas (Figura 5G).

LEGENDAS E FIGURAS

Figura 3. Média do consumo de ração diário (g) pré-cirurgia (média dos 3 dias anteriores ao procedimento). ANOVA univariada com metabolismo materno (normoglicêmica ou hiperglicêmica), dieta materna (dieta padrão ou petiscos), tratamento (salina ou leptina) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. Machos ingeriram mais ração do que fêmeas (**A**, efeito de sexo, $F(1,169) = 5.845$, $p < 0.05$, $\eta = 0.030$). Descendentes de mães hiperglicêmicas ingeriram mais ração do que de mães normoglicêmicas (**B**, efeito de metabolismo, $F(1,169) = 6.304$, $p < 0.05$, $\eta = 0.032$), efeito que foi exacerbado quando as mães hiperglicêmicas ingeriram petiscos (**C**, interação metabolismo e dieta, $F(1,169) = 7.738$, $p < 0.05$, $\eta = 0.040$). Média do peso corpóreo diário (g) pré-cirurgia (média dos 3 dias anteriores ao procedimento). ANOVA univariada com metabolismo materno (normoglicêmica ou hiperglicêmica), dieta materna (dieta padrão ou petiscos), tratamento (salina ou leptina) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. Machos apresentaram peso corpóreo maior do que fêmeas (**D**, efeito de sexo, $F(1,169) = 258.661$, $p < 0.05$, $\eta = 0.595$).

Figura 4. Ingestão alimentar diária (g) dos descendentes após início do tratamento com salina ou leptina. Dados apresentados como diferença no consumo de ração diário (g) com relação à média do consumo de ração dos 3 dias anteriores ao início do tratamento. ANOVA de medidas repetidas (tempo) com metabolismo materno (normoglicêmica ou hiperglicêmica), dieta materna (dieta padrão ou petiscos), tratamento (salina ou leptina) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. A ingestão alimentar dos descendentes aumentou com o tempo (Todas as figuras, efeito de tempo, $F(6,1014) = 42.508$, $p < 0.05$, $\eta = 0.057$). Machos ingeriram mais ração do que fêmeas (**A**, interação tempo e sexo, $F(6,1014) = 16.005$, $p < 0.05$, $\eta = 0.021$, e efeito de sexo, $F(1,169) = 46.051$, $p < 0.05$, $\eta = 0.078$). Descendentes de mães hiperglicêmicas apresentaram uma tendência a ingerirem mais ração do que de mães normoglicêmicas (**B**, efeito de metabolismo, $F(1,169) = 4.336$, $p < 0.05$, $\eta = 0.007$, tendência a interação tempo e metabolismo, $F(6,1014) = 1.784$, $p = 0.099$, $\eta = 0.002$), efeito que foi mais pronunciado nas descendentes fêmeas (**C**, interação metabolismo e sexo, $F(1,169) = 7.155$, $p < 0.05$, $\eta = 0.012$). O tratamento com leptina reduziu a ingestão alimentar (**D**, efeito de tratamento, $F(1,169) = 132.379$, $p < 0.05$, $\eta = 0.224$, e interação tempo e tratamento, $F(6,1014) = 17.915$, $p < 0.05$, $\eta = 0.024$), sendo que essa redução foi mais exacerbada em machos (**E**, efeito de tratamento e sexo, $F(1,169) = 16.633$, $p < 0.05$, $\eta = 0.028$, e interação tempo, tratamento e sexo, $F(6,1014) = 2.071$, $p = 0.054$, $\eta = 0.003$), e em descendentes de mães hiperglicêmicas (**F**, efeito de metabolismo e tratamento, $F(1,169) = 3.843$, $p = 0.052$, $\eta = 0.006$).

Figura 5. Peso corpóreo diário (g) dos descendentes após início do tratamento com salina ou leptina. Dados apresentados como diferença no peso corpóreo diário (g) com relação à média do peso corpóreo dos 3 dias anteriores ao início do tratamento ANOVA de medidas repetidas (tempo) com metabolismo materno (normoglicêmica ou hiperglicêmica), dieta materna (dieta padrão ou petiscos), tratamento (salina ou leptina) e sexo (macho ou fêmea) como fatores. De forma geral houve redução do peso corpóreo dos descendentes após a cirurgia (Todas as figuras, efeito de tempo, $F(6,1014) = 332.108$, $p < 0.05$, $\eta = 0.283$). Machos apresentaram maior peso corpóreo do que as fêmeas (**A**, efeito de sexo, $F(1,169) = 30.803$, $p < 0.05$, $\eta = 0.045$, e interação tempo e sexo, $F(6,1014) = 30.096$, $p < 0.05$, $\eta = 0.026$). Descendentes de mães hiperglicêmicas

apresentaram maior peso corpóreo do que de mães normoglicêmicas (**B**, tendência a efeito de metabolismo, $F(1,169) = 3.599$, $p = 0.060$, $\eta = 0.05$, e interação tempo e metabolismo, $F(6,1014) = 8.563$, $p < 0.05$, $\eta = 0.007$), efeito que foi mais pronunciado nas descendentes fêmeas (**C**, tendência a interação metabolismo e sexo, $F(1,169) = 3.210$, $p = 0.075$, $\eta = 0.005$, e tendência a interação tempo, metabolismo e sexo, $F(6,1014) = 2.078$, $p = 0.053$, $\eta = 0.002$). O tratamento com leptina reduziu o peso corpóreo (**D**, efeito de tratamento, $F(1,169) = 96.858$, $p < 0.05$, $\eta = 0.142$, e interação tempo e tratamento, $F(6,1014) = 64.538$, $p < 0.05$, $\eta = 0.055$), sendo que essa redução foi mais exacerbada em machos (**E**, interação tratamento e sexo, $F(1,169) = 12.674$, $p < 0.05$, $\eta = 0.019$, e interação tempo, tratamento e sexo, $F(6,1014) = 4.982$, $p < 0.05$, $\eta = 0.004$), efeito mais evidente nos machos descendentes de mães normoglicêmicas tratadas com petiscos (**F**, interação metabolismo, dieta, tratamento e sexo, $F(1,169) = 4.504$, $p < 0.05$, $\eta = 0.007$) do que do que em fêmeas (**G**).

Figura 3

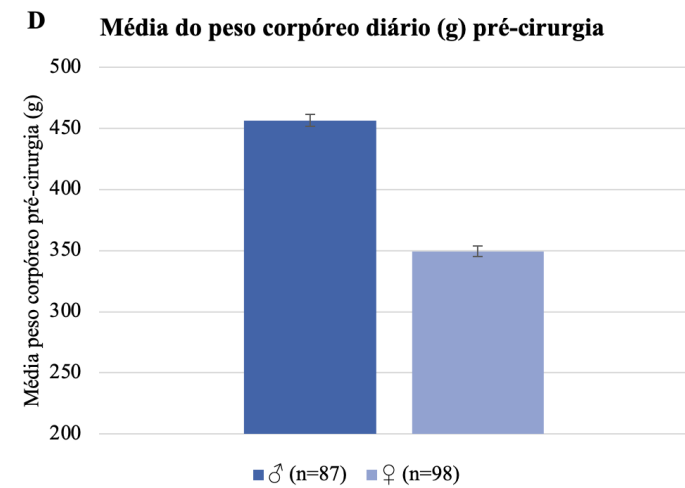
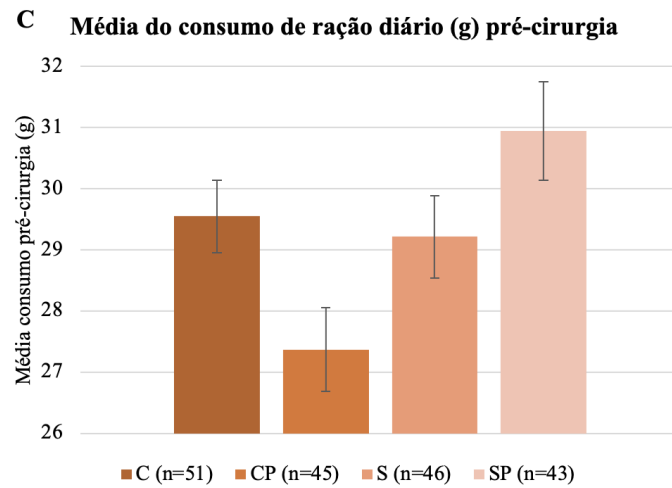
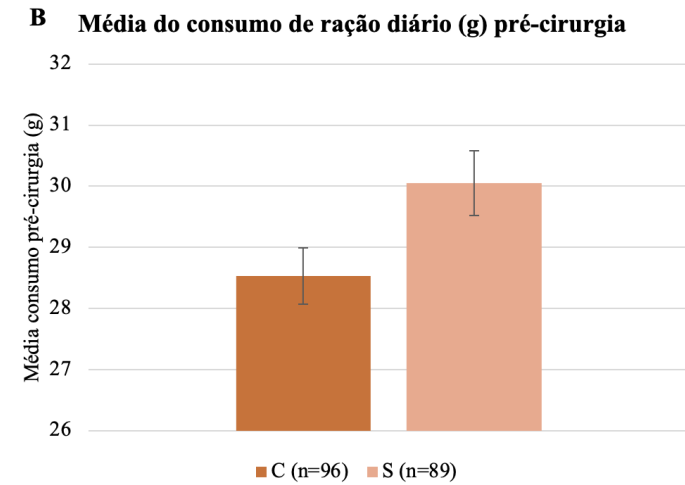
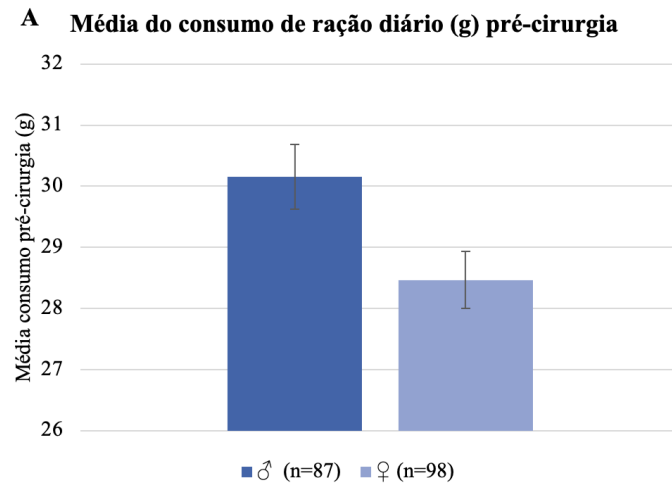


Figura 4

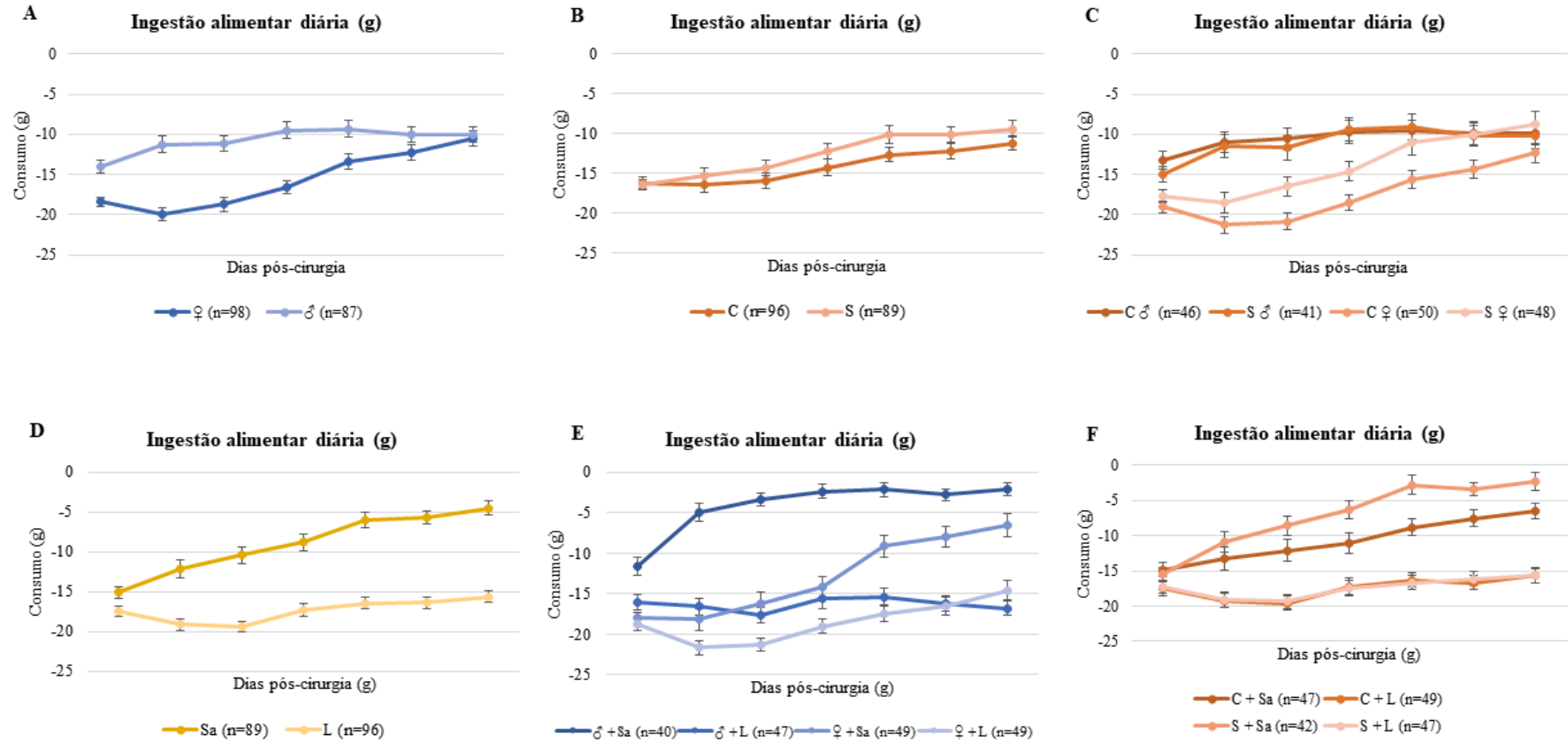
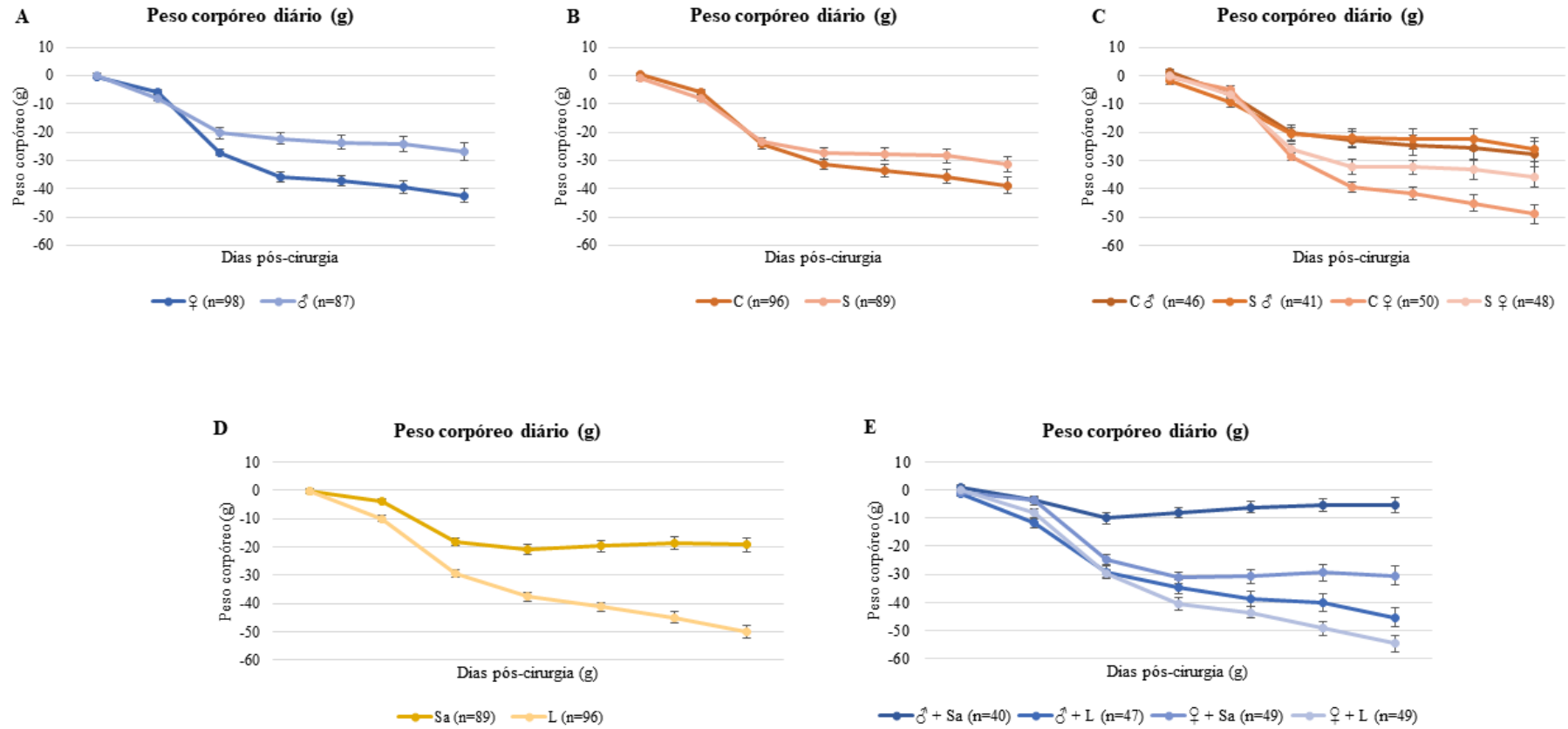
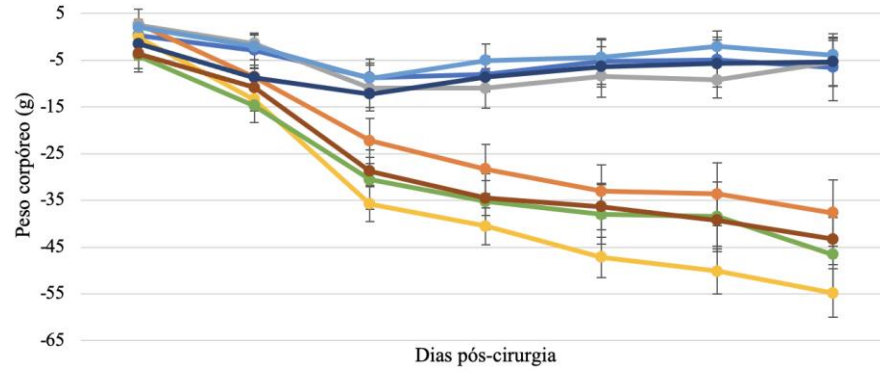


Figura 5



F

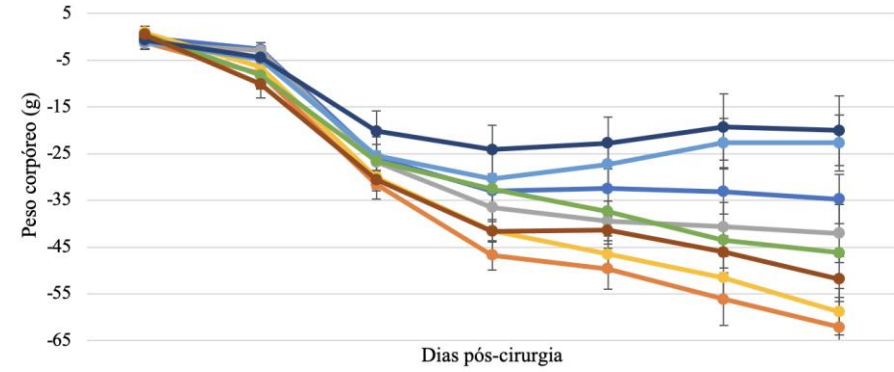
Peso corpóreo diário (g)



♂ C + Sa (n=12) ♂ C + L (n=13) ♂ CP + Sa (n=9) ♂ CP + L (n=12)
 ♂ S + Sa (n=10) ♂ S + L (n=11) ♂ SP + Sa (n=9) ♂ SP + L (n=11)

G

Peso corpóreo diário (g)



♀ C + Sa (n=13) ♀ C + L (n=13) ♀ CP + Sa (n=13) ♀ CP + L (n=11)
 ♀ S + Sa (n=12) ♀ S + L (n=13) ♀ SP + Sa (n=11) ♀ SP + L (n=12)

Discussão

No presente estudo, avaliamos os efeitos da infusão central crônica de leptina na ingestão alimentar de descendentes fêmeas e machos de mães hiperglicêmicas com nutrição inadequada durante a prenhez e lactação. A presença da hiperglicemia materna durante a prenhez aumentou a ingestão alimentar dos descendentes, sendo que esse aumento foi exacerbado nos descendentes de mães com dieta materna inadequada. A infusão central crônica de leptina reduziu a ingestão alimentar e o peso corpóreo dos animais, sendo que o efeito anorético foi mais acentuado nos descendentes machos. O metabolismo materno alterado acentuou o efeito da leptina na redução na ingestão alimentar, enquanto o padrão de redução no peso corpóreo dos descendentes foi influenciado pela dieta materna.

Nossos resultados mostraram que os descendentes de mães hiperglicêmicas apresentaram maior ingestão alimentar e maior peso corpóreo, e que esse efeito foi mais pronunciado em descendentes machos. Diversos estudos em modelos animais e na população humana demonstram que a exposição perinatal a condições metabólicas adversas, seja pela presença de uma dieta inadequada ou de distúrbios metabólicos, como o diabetes, resulta na predisposição dos descendentes a desenvolver obesidade na vida adulta (Dearden & Ozanne, 2015), e que os sistemas neurais responsáveis pela regulação do balanço energético e da ingestão alimentar podem ser modificados permanentemente durante esse período (Zeltser, 2018). Dessa forma, o aumento na ingestão alimentar pode estar diretamente relacionado à maior incidência de obesidade e doenças metabólicas ao longo da vida.

O ambiente perinatal alterado pela hiperglicemia pode ter impactado a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos, alterando vias anorexígenas e orexígenas e modificando o controle da ingestão alimentar, o que pode explicar a hiperfagia observada nesses descendentes (Dearden & Ozanne, 2015). Estudos mostram que descendentes de mães hiperglicêmicas apresentam maior densidade de neurônios hipotalâmicos que expressam NPY, neuropeptídeo que promove o aumento da ingestão alimentar (Franke et al., 2005; Andreas Plagemann et al., 1998). Apesar de não termos avaliado a expressão de neuropeptídeos hipotalâmicos relacionados ao controle da ingestão alimentar, podemos sugerir, com base no aumento da ingestão alimentar

observado, que uma alteração semelhante pode ter ocorrido com os animais do presente estudo.

A hiperfagia observada nos descendentes de mães hiperglicêmicas foi exacerbada quando essas mães receberam petiscos durante a prenhez e a lactação. Estudos da literatura mostram que descendentes de mães que consumiram uma dieta de alto teor calórico são hiperfágicos (Nivoit et al., 2009; A. Samuelsson et al., 2015). No entanto, no presente estudo, os filhos de mães normoglicêmicas que ingeriram petiscos não apresentaram aumento na ingestão alimentar. Sendo assim, sugerimos que a hiperfagia exacerbada nos descendentes de mães hiperglicêmicas que ingeriram petiscos pode estar relacionada ao agravamento da intolerância à glicose materna, levando a alterações mais drásticas nos circuitos de controle de ingestão alimentar. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, utilizando o mesmo modelo experimental, mostraram que o oferecimento de petiscos leva ao agravamento da intolerância à glicose materna de ratas previamente hiperglicêmicas (Martins et al., 2021b). Cabe ressaltar que o presente estudo emprega um modelo experimental de hiperglicemia moderada (Kiss, 2009), e que os estudos citados anteriormente sobre hiperfagia e alterações no controle da ingestão alimentar dos descendentes de mães hiperglicêmicas utilizam animais com níveis glicêmicos mais elevados (Fahrenkrog et al., 2004; Franke et al., 2005), corroborando nossa hipótese. Estudos futuros do nosso grupo de pesquisa irão avaliar a expressão de neuropeptídios relacionados à ingestão alimentar nesses animais.

As alterações na ingestão alimentar observadas em descendentes de mães hiperglicêmicas foram mais pronunciadas em machos. Apesar de a maioria dos estudos ainda ignorar os efeitos de sexo, trabalhos sugerem que as respostas da prole ao ambiente intrauterino alterado por distúrbios metabólicos e/ou variações na nutrição materna são diferentes entre os sexos, e que isso pode ocorrer devido às diferenças sexuais inerentes ao desenvolvimento hipotalâmico ou à especificidade de cada sexo aos desafios ambientais (Mela et al., 2012; A. M. Samuelsson et al., 2013; Vickers et al., 2011), corroborando nossos resultados. Um estudo realizado com ratas que receberam dieta hipercalórica durante a prenhez e lactação mostra que tanto a prole feminina quanto a masculina são vulneráveis à perturbação nutricional do organismo materno e que ambos os sexos estão acima do peso no momento do desmame. Porém, apenas as fêmeas mantêm o fenótipo metabólico alterado com o passar do tempo,

indicando que a resposta dos sexos ao insulto ocorre de maneira diferente (Dearden & Balthasar, 2014).

Após a avaliação do padrão de ingestão alimentar basal dos descendentes, foi avaliada a resposta à infusão central crônica de leptina. Nossos resultados mostraram que a administração ICV de leptina reduziu a ingestão alimentar e o peso corporal em todos os animais, corroborando estudos da literatura (Clegg et al., 2003; Kanoski et al., 2011; Riedman, 1997; Seeley, R. J., 1996).

A redução no peso corporal durante o tratamento com leptina foi mais exacerbada em filhos de mães normoglicêmicas que receberam petiscos. A dieta materna inadequada, seja ela uma HFD ou uma dieta rica em açúcar, está associada à hiperfagia e resistência à leptina nos descendentes (Glavas et al., 2010; Kirk et al., 2009), o que modifica a expressão e regulação de neuropeptídeos, tais como NPY e AgRP (Chen et al., 2009). Esse quadro pode contribuir com o desenvolvimento da obesidade (Kirk et al., 2009). No entanto, no presente estudo, houve uma resposta mais exacerbada na redução do peso corporal nos descendentes de mães tratadas com petiscos, sugerindo o oposto, ou seja, uma maior sensibilidade central à leptina. Essa diferença pode se dar pelo fato de que o modelo experimental de oferecimento de petiscos difere em alguns aspectos das dietas de estudos da literatura que normalmente utilizam dietas HF ou dietas ricas em açúcares (Chen et al., 2009; Glavas et al., 2010; Kirk et al., 2009; Maria et al., 2012). Sabe-se que os efeitos da dieta materna para os descendentes variam de acordo com o tipo de dieta oferecida e sua composição (Islam & Wilson, 2012). Além disso, no presente estudo, o mesmo efeito não foi observado em filhos de mães hiperglicêmicas que ingeriram os petiscos, sugerindo que, na presença da hiperglicemia materna, esse efeito é atenuado. Como colocado anteriormente, descendentes de mães hiperglicêmicas apresentam hiperfagia nesse estudo e demais da literatura (Dearden & Ozanne, 2015), condição pré-existente ao tratamento com leptina, o que pode ter contribuído para o atual resultado.

Com relação a ingestão alimentar, descendentes de mães hiperglicêmicas apresentaram uma redução mais drástica na ingestão alimentar após infusão de leptina do que os descendentes de mães normoglicêmicas. Efeito semelhante foi observado com a insulina em um trabalho anterior do nosso grupo de pesquisa, que revelou que filhos de mães hiperglicêmicas são mais sensíveis aos efeitos anoréticos da infusão central crônica desse hormônio (Oliveira et al., 2018). Já um estudo da literatura

mostrou que recém-nascidos de mães hiperglicêmicas apresentam redução na capacidade da leptina de ativar as vias de sinalização intracelular no núcleo arqueado do hipotálamo, assim como uma redução no número de projeções neurais do núcleo arqueado para o núcleo paraventricular, sugerindo uma possível resistência central à leptina (Steculorum & Bouret, 2011). A diferença na resposta dos descendentes pode estar relacionada ao grau de hiperglicemia materna. Como já colocado anteriormente, as mães do presente estudo apresentam diabetes moderado (Kiss, 2009), com níveis glicêmicos abaixo dos normalmente encontrados em trabalhos da literatura (Fahrenkrog et al., 2004; Franke et al., 2005). Outras alterações observadas nos descendentes de mães hiperglicêmicas já foram relacionadas à intensidade da hiperglicemia materna, como alterações no comportamento (Kiss, 2012). Sendo assim, sugere-se que a sensibilidade à leptina pode estar relacionada aos níveis glicêmicos maternos.

Cabe ressaltar que os efeitos relacionados ao metabolismo materno observados na resposta à leptina não sofreram influência da dieta materna. Trabalhos da literatura mostram que descendentes de mães que tiveram acesso a HFD apresentam maior peso corpóreo, maior adiposidade, maiores concentrações de leptina e uma tolerância à glicose diminuída no momento do desmame, bem como maior suscetibilidade à obesidade na vida adulta (Tamashiro et al., 2009). Outros estudos mostram que o consumo materno de HFD aumenta a concentração de leptina plasmática na prole já no DPN 7, sugerindo a possibilidade de efeitos significativos no desenvolvimento hipotalâmico dos filhotes e na sensibilidade à leptina (Sun et al., 2012). Outro estudo revelou que fetos de mães que consumiram HFD durante a prenhez apresentam aumento na expressão de NPY e POMC no núcleo arqueado (Klein et al., 2018). No entanto, no presente estudo não foi observado nenhum efeito significativo da dieta materna na sensibilidade à leptina dos descendentes, o que pode estar relacionado ao modelo empregado de oferecimento de petiscos, que é diferente do modelo de HFD utilizado nos estudos citados (Hoch et al., 2014). Cabe ressaltar que esse é o primeiro estudo no qual ambas as condições maternas, nutrição inadequada e hiperglicemia, foram estudadas de forma associada. Assim, mais avaliações são necessárias para uma compreensão mais completa dos nossos achados, como a dos neuropeptídeos hipotalâmicos, já citadas anteriormente, além da dosagem dos níveis de hormônios como leptina e insulina, que estão atualmente em andamento.

Por fim, houve uma diferença relacionada ao sexo na resposta à infusão central crônica de leptina, sendo que os machos responderam de maneira mais exacerbada. Um estudo que também realizou administração ICV de leptina em machos e fêmeas, mas de forma aguda, encontrou resultados similares aos encontrados no presente estudo, no qual machos respondem de maneira mais exacerbada aos efeitos anoréticos desse hormônio. Os autores sugerem que pode haver diferenças de expressão do receptor de leptina ou nas cascatas de sinalização intracelular entre machos e fêmeas, indicando que os controles centrais sobre a homeostase energética diferem entre os sexos (Clegg et al., 2003). A exposição materna a uma dieta com alto teor de gordura durante a prenhez e lactação resulta na diminuição da sensibilidade à leptina central em machos. No entanto, na prole feminina, a exposição somente durante a prenhez é suficiente para diminuir a sensibilidade à leptina, revelando um dimorfismo sexual na programação da sensibilidade a esse hormônio (Sun et al., 2012). Mais estudos precisam ser conduzidos para a compreensão dos efeitos do sexo do descendente nesses parâmetros. Sabe-se que os hormônios sexuais desempenham um importante papel no controle metabólico do organismo (Clegg et al., 2006; Massa & Correa, 2020). A dosagem de testosterona nos descendentes machos do presente estudo está atualmente em andamento e, juntamente com as dosagens de insulina e leptina, poderão auxiliar para uma melhor compreensão dos efeitos observados.

Concluindo, no presente estudo, observamos que o agravamento do quadro de hiperglicemia materna proporcionado pelo consumo de petiscos (Martins et al., 2021b) modificou o padrão de ingestão alimentar dos descendentes, corroborando nossa hipótese inicial. Apesar de estudos da literatura indicarem uma resistência à leptina periférica (Kahraman et al., 2014) e central (Steculorum & Bouret, 2011) em descendentes de mães hiperglicêmicas, em nosso estudo esses animais apresentaram redução mais acentuada na ingestão alimentar após o tratamento central com leptina. Cabe ressaltar que nesse estudo foi empregado um modelo de diabetes moderado durante a prenhez, com níveis glicêmicos abaixo daqueles usualmente presentes em outros trabalhos da literatura (Kiss, 2009), mas que, mesmo assim, os descendentes apresentaram hiperfagia, mostrando que a hiperglicemia materna moderada é suficiente para alterar a ingestão alimentar dos descendentes. Além disso, esses animais apresentaram uma resposta diferente à leptina daquela observada em estudos com animais com hiperglicemia severa. No entanto, apesar de estudos na literatura

mostrarem que a nutrição materna inadequada altera neuropeptídeos de controle da ingestão alimentar (Klein et al., 2018) e também os níveis séricos e vias de sinalização da leptina (Glavas et al., 2010), não foram observados efeitos significativos da dieta materna na resposta à leptina, somente uma diferença relacionada ao sexo. A ausência de diferenças relacionadas à dieta materna pode estar relacionada ao modelo experimental de oferecimento de petiscos utilizado. O modelo empregado tem a vantagem de ser mais próximo à realidade da população humana, pois mimetiza a ingestão de alimentos hipercalóricos além da dieta usual, sendo que o indivíduo pode modular sua ingestão (Hoch et al., 2014). Já os modelos de dieta materna usualmente empregados, como HFD, levam a uma alteração nutricional mais pronunciada, explicando a presença de alterações mais drásticas nos descendentes. Por fim, é importante ressaltar que mesmo um modelo experimental com níveis glicêmicos moderados, associado a um modelo com discreta alteração nutricional, resultou em alterações na ingestão alimentar dos descendentes, reforçando a importância do controle glicêmico e nutricional das gestantes para prevenir alterações nos descendentes e, com isso, o efeito transgeracional da obesidade e doenças relacionadas.

Conclusões

1. O agravamento do quadro de hiperglicemia materna pelo consumo de petiscos modificou o padrão de ingestão alimentar dos descendentes.
2. A presença da hiperglicemia materna durante a prenhez aumentou a ingestão alimentar dos descendentes, sendo que esse aumento foi mais exacerbado nos descendentes de mães com dieta materna inadequada.
3. A infusão central crônica de leptina reduziu a ingestão alimentar e o peso corpóreo dos animais, sendo que o efeito anorético foi mais acentuado nos descendentes machos.
4. O metabolismo materno alterado acentuou o efeito da leptina na redução na ingestão alimentar, enquanto o padrão de redução no peso corpóreo dos descendentes foi influenciado pela dieta materna.

Referências Bibliográficas

- Abizaid, A., Kyriazis, D., & Woodside, B. (2004). Effects of leptin administration on lactational infertility in food-restricted rats depend on milk delivery. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 286(1 55-1), 217–225. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00128.2003>
- ADA. (2018). 2. *Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes*. 41(January), 13–27. <https://doi.org/10.2337/dc18-S002>
- Agarwal, P., Morriseau, T. S., Kereliuk, S. M., Christine, A., Wicklow, B. A., Dolinsky, V. W., Agarwal, P., Morriseau, T. S., Kereliuk, S. M., Christine, A., Wicklow, B. A., & Dolinsky, V. W. (2018). Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Maternal obesity , diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 0(0), 71–101. <https://doi.org/10.1080/10408363.2017.1422109>
- Ahima, R. S., & Osei, S. Y. (2004). Leptin signaling. *Physiology and Behavior*, 81(2), 223–241. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2004.02.014>
- Ainge, H., Thompson, C., Ozanne, S. E., & Rooney, K. B. (2011). A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control. *International Journal of Obesity*, 35(3), 325–335. <https://doi.org/10.1038/ijo.2010.149>
- Air, E. L., Benoit, S. C., Clegg, D. J., Seeley, R. J., & Woods, S. C. (2002). Insulin and leptin combine additively to reduce food intake and body weight in rats. *Endocrinology*, 143(6), 2449–2452. <https://doi.org/10.1210/endo.143.6.8948>
- Alfaradhi, M. Z., & Ozanne, S. E. (2011). *Developmental programming in response to maternal overnutrition*. 2(June), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fgene.2011.00027>
- Armitage, J. A., Khan, I. Y., Taylor, P. D., Nathanielsz, P. W., & Poston, L. (2004). *Developmental programming of the metabolic syndrome by maternal nutritional imbalance : how strong is the evidence from experimental models in mammals ?* 2, 355–377. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072009>
- Asarian, L., & Geary, N. (2013). Sex differences in the physiology of eating. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*,

- 305(11). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00446.2012>
- Ashino, N. G., Saito, K. N., Souza, F. D., Nakutz, F. S., Roman, E. A., Velloso, L. A., Torsoni, A. S., & Torsoni, M. A. (2012). Maternal high-fat feeding through pregnancy and lactation predisposes mouse offspring to molecular insulin resistance and fatty liver. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(4), 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.12.011>
- Barnes, S. K., & Ozanne, S. E. (2011). Pathways linking the early environment to long-term health and lifespan. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 106(1), 323–336. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2010.12.005>
- Bayol, A., Farrington, S. J., & Stickland, N. C. (2007). A maternal ‘junk food’ diet in pregnancy and lactation promotes an exacerbated taste for ‘junk food’ and a greater propensity for obesity in rat offspring. 44, 843–851. <https://doi.org/10.1017/S0007114507812037>
- Bear. (2017). Neurociências de Bear. In *Psicologia e Sociedade* (Vol. 25, Issue 3).
- Belgardt, B. F., & Brüning, J. C. (2010). CNS leptin and insulin action in the control of energy homeostasis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1212, 97–113. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05799.x>
- Bellisle, F. (2014). Meals and snacking, diet quality and energy balance. *Physiology and Behavior*, 134(C), 38–43. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.03.010>
- Boron, Walter F., and E. L. B. (2016). Medical Physiology. *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952.
- Bouret, S. G. (2017). *Development of Hypothalamic Circuits That Control Food Intake and Energy Balance*. (R. B. S. Harris (ed.); pp. 135–154). <https://doi.org/10.1201/9781315120171-7>
- Catalano, P. M., Tyzbir, E. D., Roman, N. M., Amini, S. B., & Sims, E. A. H. (1991). Longitudinal changes in insulin release and insulin resistance in nonobese pregnant women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 165(6), 1667–1672. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(91\)90012-G](https://doi.org/10.1016/0002-9378(91)90012-G)
- Chan, J. L., Heist, K., DePaoli, A. M., Veldhuis, J. D., & Mantzoros, C. S. (2003). The role of falling leptin levels in the neuroendocrine and metabolic adaptation to short-term starvation in healthy men. *Journal of Clinical Investigation*, 111(9), 1409–1421. <https://doi.org/10.1172/JCI200317490>
- Chapelot, D. (2011). The role of snacking in energy balance: A biobehavioral approach

- 1,2. *Journal of Nutrition*, 141(1), 158–162. <https://doi.org/10.3945/jn.109.114330>
- Chen, H., Simar, D., & Morris, M. J. (2009). Hypothalamic neuroendocrine circuitry is programmed by maternal obesity: Interaction with postnatal nutritional environment. *PLoS ONE*, 4(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006259>
- Cianni, G. Di, Miccoli, R., Volpe, L., Lencioni, C., & Prato, S. Del. (2003). *Intermediate metabolism in normal pregnancy and in gestational diabetes*. July 2002, 259–270. <https://doi.org/10.1002/dmrr.390>
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C., & Benoit, S. C. (2006). *Gonadal Hormones Determine Sensitivity to Central Leptin and Insulin*.
- Clegg, D. J., Riedy, C. A., Smith, K. A. B., Benoit, S. C., & Woods, S. C. (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*, 52(3), 682–687. <https://doi.org/10.2337/diabetes.52.3.682>
- Cowley, M. A., Smart, J. L., Rubinstein, M., Diano, S., Horvath, T. L., Cone, R. D., Cerda, M. G., Low, M. J., & Gene, Â. (2001). *Leptin activates anorexigenic POMC neurons through a neural network in the arcuate nucleus*. 411(May).
- Dearden, L., & Balthasar, N. (2014). Sexual dimorphism in offspring glucose-sensitive hypothalamic gene expression and physiological responses to maternal high-fat diet feeding. *Endocrinology*, 155(6), 2144–2154. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1131>
- Dearden, L., & Ozanne, S. E. (2015). Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 39, 3–16. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.08.001>
- Edgerton, D. S., Kraft, G., Smith, M., Farmer, B., Williams, P. E., Coate, K. C., Printz, R. L., Brien, R. M. O., & Cherrington, A. D. (2017). *Insulin 's direct hepatic effect explains the inhibition of glucose production caused by insulin secretion*. 2(6), 1–14.
- Ezgi, Ş., & Kabaran, S. (2019). *Maternal Obesity , Maternal Overnutrition and Fetal Programming : Effects of Epigenetic Mechanisms on the Development of Metabolic Disorders*. 419–427. <https://doi.org/10.2174/1389202920666191030092225>
- Fahrenkrog, S., Harder, T., Stolaczyk, E., Melchior, K., Franke, K., Dudenhausen, J. W., & Plagemann, A. (2004). Cross-Fostering to Diabetic Rat Dams Affects Early

- Development of Mediobasal Hypothalamic Nuclei Regulating Food Intake, Body Weight, and Metabolism. *Journal of Nutrition*, 134(3), 648–654. <https://doi.org/10.1093/jn/134.3.648>
- Fetita, L. (2014). *REVIEW: Consequences of Fetal Exposure to Maternal*. 91(June), 3718–3724. <https://doi.org/10.1210/jc.2006-0624>
- Franke, K., Harder, T., Aerts, L., Melchior, K., Fahrenkrog, S., Rodekamp, E., Ziska, T., Van Assche, F. A., Dudenhausen, J. W., & Plagemann, A. (2005). “Programming” of orexigenic and anorexigenic hypothalamic neurons in offspring of treated and untreated diabetic mother rats. *Brain Research*, 1031(2), 276–283. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2004.11.006>
- Galicia-Garcia, U., Benito-Vicente, A., Jebari, S., Larrea-Sebal, A., Siddiqi, H., Uribe, K. B., Ostolaza, H., & Martín, C. (2020). Pathophysiology of type 2 diabetes mellitus. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(17), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms21176275>
- Garcia-Vargas, L., Addison, S. S., Nistala, R., Kurukulasuriya, D., & Sowers, J. R. (2012). Gestational Diabetes and the Offspring: Implications in the Development of the Cardiorenal Metabolic Syndrome in Offspring. *Cardiorenal Medicine*, 2(2), 134–142. <https://doi.org/10.1159/000337734>
- Gawli, K., Gawli, D., Filip, M., & Przegali, E. (2020). *Relationship of maternal high-fat diet during pregnancy and lactation to offspring health*. 0(0), 1–17. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuaa020>
- Gelardi, N. L. (1988). *Maternal Hyperglycemia in Pregnant Rats: Its Effect on Growth and Carbohydrate Metabolism in the Offspring*. 1146–1151.
- Glavas, M. M., Kirigiti, M. A., Xiao, X. Q., Enriori, P. J., Fisher, S. K., Evans, A. E., Grayson, B. E., Cowley, M. A., Smith, M. S., & Grove, K. L. (2010). Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. *Endocrinology*, 151(4), 1598–1610. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1295>
- Hales, C. N., & Barker, D. J. P. (2013). *Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis* * , y. i, 1215–1222. <https://doi.org/10.1093/ije/dyt133>
- Hans-Rudolf Berthoud. (2011). Metabolic and hedonic drives in the neural control of appetite: Who’s the boss? *Bone*, 23(1), 1–7.

- <https://doi.org/10.1016/j.conb.2011.09.004>. Metabolic
- Hess, J. M., Jonnalagadda, S. S., & Slavin, J. L. (2016). What is a snack, why do we snack, and how can we choose better snacks? A review of the definitions of snacking, motivations to snack, contributions to dietary intake, and recommendations for improvement. *Advances in Nutrition*, 7(3), 466–475. <https://doi.org/10.3945/an.115.009571>
- Hill, J. O., Wyatt, H. R., & Peters, J. C. (2013). *Obesity and Weight Management*. August, 111–115. <https://doi.org/10.17925/EE.2013.09.02.111>
- Hill, J. O., Wyatt, H. R., Peters, J. C., Hill, J. O., Wyatt, H. R., & Peters, J. C. (2012). *Energy Balance and Obesity Energy Balance: Definitions*. 126–132. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.087213>
- Hoch, T., Pischetsrieder, M., & Hess, A. (2014). Snack food intake in ad libitum fed rats is triggered by the combination of fat and carbohydrates. *Frontiers in Psychology*, 5(MAR), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2014.00250>
- Hopkins, M., & Blundell, J. E. (2016). *Energy balance , body composition , sedentariness and appetite regulation: pathways to obesity*. 1615–1628. <https://doi.org/10.1042/CS20160006>
- Hsu, C. N., & Tain, Y. L. (2019). *The Good , the Bad , and the Ugly of Pregnancy*.
- Islam, M. S., & Wilson, R. D. (2012). *Experimentally Induced Rodent Models of Type 2 Diabetes*. 933. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-068-7>
- Jawerbaum, A., & White, V. (2017). Review on intrauterine programming : Consequences in rodent models of mild diabetes and mild fat overfeeding are not mild. *Placenta*, 52, 21–32. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2017.02.009>
- Jones, H. N., Woollett, L. A., Barbour, N., Prasad, P. D., Powell, T. L., & Jansson, T. (2009). High-fat diet before and during pregnancy causes marked up-regulation of placental nutrient transport and fetal overgrowth in C57/BL6 mice. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(1), 271–278. <https://doi.org/10.1096/fj.08-116889>
- Kahraman, S., Dirice, E., De Jesus, D. F., Hu, J., & Kulkarni, R. N. (2014). Maternal insulin resistance and transient hyperglycemia impact the metabolic and endocrine phenotypes of offspring. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 307(10), E906–E918. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00210.2014>
- Kanoski, S. E., Hayes, M. R., Greenwald, H. S., Fortin, S. M., Gianessi, C. A., Gilbert,

- J. R., & Grill, H. J. (2011). Hippocampal leptin signaling reduces food intake and modulates food-related memory processing. *Neuropsychopharmacology*, *36*(9), 1859–1870. <https://doi.org/10.1038/npp.2011.70>
- Kervran, A., Guillaume, M., & Jost, A. (1978). *Diabetologia*. *393*, 387–393.
- Kirk, S. L., Samuelsson, A. M., Argenton, M., Dhonye, H., Kalamatianos, T., Poston, L., Taylor, P. D., & Coen, C. W. (2009). Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS ONE*, *4*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005870>
- Kiss, A. C. I. et al. (2009). *Diabetology & Metabolic Syndrome Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes*. *7*, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-1-21>
- Kiss, A. C. I. et al. (2012). Impact of maternal mild hyperglycemia on maternal care and offspring development and behavior of Wistar rats. *Physiology and Behavior*, *107*(3), 292–300. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2012.08.001>
- Klein, M. O., MacKay, H., Edwards, A., Park, S. Bin, Kiss, A. C. I., Felicio, L. F., & Abizaid, A. (2018). POMC and NPY mRNA expression during development is increased in rat offspring brain from mothers fed with a high fat diet. *International Journal of Developmental Neuroscience*, *64*, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2017.03.004>
- Klump, K. L., Culbert, K. M., & Sisk, C. L. (2017). Sex Differences in Binge Eating: Gonadal Hormone Effects Across Development. *Annual Review of Clinical Psychology*, *13*(March), 183–207. <https://doi.org/10.1146/annurev-clinpsy-032816-045309>
- Koletzko, B., Godfrey, K. M., Poston, L., Szajewska, H., Goudoever, J. B. Van, & Waard, M. De. (2019). *Europe PMC Funders Group Nutrition during pregnancy, lactation, and early childhood and its implications for maternal and long-term child health: the EarlyNutrition Project recommendations*. *74*(2), 93–106. <https://doi.org/10.1159/000496471.Nutrition>
- Lemes, S. F., de Souza, A. C. P., Payolla, T. B., Versutti, M. D., de Fátima da Silva Ramalho, A., Mendes-da-Silva, C., Souza, C. M., Milanski, M., Torsoni, A. S., & Torsoni, M. A. (2018). Maternal Consumption of High-fat Diet in Mice Alters Hypothalamic Notch Pathway, NPY Cell Population and Food Intake in Offspring. *Neuroscience*, *371*, 1–15.

- <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2017.11.043>
- Mahizir, D., Briffa, J. F., Hryciw, D. H., Wadley, G. D., Moritz, K. M., & Wlodek, M. E. (2016). Maternal obesity in females born small: Pregnancy complications and offspring disease risk. *Molecular Nutrition and Food Research*, *60*(1), 8–17. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201500289>
- Margetic, S., Gazzola, C., Pegg, G. G., & Hill, R. A. (2002). Leptin: A review of its peripheral actions and interactions. *International Journal of Obesity*, *26*(11), 1407–1433. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0802142>
- Maria, A., Alini, V., Eduardo, S., Mandarin-de-lacerda, C. A., & Mandarin-de-lacerda, C. A. (2012). *Maternal High-Fat Diet Programs for Metabolic Disturbances in Offspring despite Leptin Sensitivity*. 272–284. <https://doi.org/10.1159/000336377>
- Mark, P. J., Sisala, C., Connor, K., Patel, R., Lewis, J. L., Vickers, M. H., Waddell, B. J., & Sloboda, D. M. (2011). A maternal high-fat diet in rat pregnancy reduces growth of the fetus and the placental junctional zone, but not placental labyrinth zone growth. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, *2*(1), 63–70. <https://doi.org/10.1017/S2040174410000681>
- Martins, M. G., Cruz, A. G. da, Oliveira, G. P. de, Woodside, B., Horta-Júnior, J. de A. de C. e., & Kiss, A. C. I. (2021a). Effects of snack intake during pregnancy and lactation on reproductive outcome in mild hyperglycemic rats. *Physiology and Behavior*, *240*(April). <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113544>
- Martins, M. G., Cruz, A. G. da, Oliveira, G. P. de, Woodside, B., Horta-Júnior, J. de A. de C. e., & Kiss, A. C. I. (2021b). Effects of snack intake during pregnancy and lactation on reproductive outcome in mild hyperglycemic rats. *Physiology & Behavior*, *240*(July), 113544. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2021.113544>
- Massa, M. G., & Correa, S. M. (2020). *Sexes on the Brain: Sex as Multiple Biological Variables in the Neuronal Control of Feeding*. 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.165840>.Sexes
- Mathias, J. R., Dodd, M. E., Walters, K. B., Yoo, S. K., Erik, A., & Huttenlocher, A. (2014). Rat Maternal Obesity and High Fat Diet Program Offspring Metabolic Syndrome. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, *211*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2014.03.025>.Rat
- Mcmillen, I. C., Maclaughlin, S. M., Muhlhausler, B. S., Gentili, S., Duffield, J. L., &

- Morrison, J. L. (2008). *Developmental Origins of Adult Health and Disease : The Role of Periconceptional and Foetal Nutrition.* 82–89. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2007.00188.x>
- Mela, V., Díaz, F., Gertler, A., Solomon, G., Argente, J., Viveros, M. P., & Chowen, J. A. (2012). Neonatal Treatment with a Pegylated Leptin Antagonist has a Sexually Dimorphic Effect on Hypothalamic Trophic Factors and Neuropeptide Levels. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(5), 756–765. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2012.02279.x>
- Merzouk, H., et al. (2000). *Time course of changes in serum glucose , insulin , lipids and tissue lipase activities in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes.* December 2015. <https://doi.org/10.1042/CS19990109>
- Merzouk, H., et al. (2001). Age-related changes in cholesterol metabolism in macrosomic offspring of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Journal Lipid Research*, 42(7), 1152–1159. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)31606-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)31606-0)
- Merzouk, Hafida, et al. (2002). *Age-Related Changes in Fatty Acids in Obese Offspring of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats.*
- Muhlhausler, B., & Smith, S. R. (2009). Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(2), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.10.006>
- Muhlhausler, Beverly S., et al. (2013). *Pregnancy , obesity and insulin resistance : maternal overnutrition and the target windows of fetal development.* 15(1), 25–36. <https://doi.org/10.1515/hmbci-2013-0029>
- Muhlhausler, B. S., Gugusheff, J. R., Ong, Z. Y., & Vithayathil, M. A. (2015). *Gestational Diabetes Mellitus and Macrosomia: A Literature Review.* <https://doi.org/10.1159/000371628>
- Myers, M. G., & Olson, D. P. (2012). Central nervous system control of metabolism. *Nature*, 491(7424), 357–363. <https://doi.org/10.1038/nature11705>
- Nivoit, P., Morens, C., Assche, F. A. Van, & Jansen, E. (2009). *Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia , adiposity and insulin resistance.* 1133–1142. <https://doi.org/10.1007/s00125-009-1316-9>
- O'Connor, L., Brage, S., Griffin, S. J., Wareham, N. J., & Forouhi, N. G. (2015). The cross-sectional association between snacking behaviour and measures of adiposity: The Fenland Study, UK. *British Journal of Nutrition*, 114(8), 1286–

1293. <https://doi.org/10.1017/S000711451500269X>
- Oliveira, G. P., Martins, M. G., Cruz, A. G., & Kiss, A. C. I. (2018). Efeitos da infusão central crônica de insulina na ingestão alimentar de descendentes de ratas com hiperglicemia moderada. *In: XLI Reunião Anual Da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento - SBNeC, 2018, 2018, Santos, SP. Anais Da XLI Reunião.*
- Ong, K. K. L., Ahmed, M. L., Emmett, P. M., Preece, M. A., & Dunger, D. B. (2000). *Association between postnatal catch-up growth and obesity in childhood: prospective cohort study.* 967–971.
- Ortega-Senovilla, H., Schaefer-Graf, U., Meitzner, K., Abou-Dakn, M., Graf, K., Kintscher, U., & Herrera, E. (2011). Gestational diabetes mellitus causes changes in the concentrations of adipocyte fatty acid-binding protein and other adipocytokines in cord blood. *Diabetes Care, 34*(9), 2061–2066. <https://doi.org/10.2337/dc11-0715>
- Park, H. K., & Ahima, R. S. (2014). Physiology of leptin: energy homeostasis, neuroendocrine function and metabolism. *Bone, 23*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.08.004>. Physiology
- Paxinos, G., & Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates: Hard Cover Edition.* Elsevier Science. <https://books.google.com.br/books?id=4OBQ8wpK0usC>
- Pinheiro-Castro, N., Silva, L. B. A. R., Novaes, G. M., & Ong, T. P. (2019). *Hypercaloric Diet-Induced Obesity and Obesity-Related Metabolic Disorders in Experimental Models.* 149–161. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-12668-1>
- Plagemann, A. (2011). Maternal diabetes and perinatal programming. *Early Human Development, 87*(11), 743–747. <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2011.08.018>
- Plagemann, Andreas. (2004). “Fetal programming” and “functional teratogenesis”: On epigenetic mechanisms and prevention of perinatally acquired lasting health risks. *Journal of Perinatal Medicine, 32*(4), 297–305. <https://doi.org/10.1515/JPM.2004.055>
- Plagemann, Andreas, Harder, T., Rake, A., Melchior, K., Rittel, F., Rohde, W., & Dörner, G. (1998). Hypothalamic insulin and neuropeptide Y in the offspring of gestational diabetic mother rats. *NeuroReport, 9*(18), 4069–4073.

- <https://doi.org/10.1097/00001756-199812210-00012>
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). *The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus*. 1–21. <https://doi.org/10.3390/ijms19113342>
- Ren, C., & Tao, Q. (2020). *Neural Circuits Underlying Innate Fear BT - Neural Circuits of Innate Behaviors*. https://doi.org/10.1007/978-981-15-7086-5_1
- Reynolds, C. M., Gray, C., Li, M., Segovia, S. A., & Vickers, M. H. (2015). *in Later Life*. 8090–8111. <https://doi.org/10.3390/nu7095384>
- Riedman, J. E. M. F. (1997). *Physiological response to long-term peripheral and central leptin infusion in lean and obese mice*. 94(August), 8878–8883.
- Roden, M., & Shulman, G. I. (2019). The integrative biology of type 2 diabetes. *Nature*, 576(7785), 51–60. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1797-8>
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., & Makowski, L. (2009). Cafeteria Diet Is a Robust Model of Human Metabolic Syndrome With Liver and Adipose Inflammation: Comparison to High-Fat Diet. *Obesity*, 19(6), 1109–1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>
- Samuelsson, A. M., Matthews, P. A., Jansen, E., Taylor, P. D., & Poston, L. (2013). Sucrose feeding in mouse pregnancy leads to hypertension, and sex-linked obesity and insulin resistance in female offspring. *Frontiers in Physiology*, 4 FEB(February), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00014>
- Samuelsson, A., Matthews, P. A., Argenton, M., Christie, M. R., McConnell, J. M., Jansen, E. H. J. M., Piersma, A. H., Ozanne, S. E., Twinn, D. F., Remacle, C., Rowlerson, A., Poston, L., & Taylor, P. D. (2015). *Diet-Induced Obesity in Female Mice Leads to Offspring and Insulin Resistance A Novel Murine Model of Developmental Programming*. 383–393. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.101477>
- Sandoval, D., Cota, D., & Seeley, R. J. (2008). *The Integrative Role of CNS Fuel-Sensing Mechanisms in Energy Balance and Glucose Regulation*. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.70.120806.095256>
- Seeley, R. J., et al. (1996). *Intraventricular leptin reduces food intake and body weight of lean rats but not obese Zucker rats*. 28, 664–668.
- Simerly, R. B. (2002). Wired for reproduction: Organization and development of

- sexually dimorphic circuits in the mammalian forebrain. *Annual Review of Neuroscience*, 25, 507–536. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.25.112701.142745>
- Slining, M. M., Mathias, K. C., & Popkin, B. M. (2013). Trends in food and beverage sources among US children and adolescents: 1989-2010. *Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics*, 113(12), 1682–1694. <https://doi.org/10.1016/j.jand.2013.06.001>.Trends
- Small, L., Brandon, A. E., Turner, N., & Cooney, G. J. (2018). Modeling insulin resistance in rodents by alterations in diet: What have high-fat and high-calorie diets revealed? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 314(3), E251–E265. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00337.2017>
- Spencer, S. J. (2012). *Early Life Programming of Obesity : The Impact of the Perinatal Environment on the Development of Obesity and Metabolic Dysfunction in the Offspring* . 61 3, 55–68.
- Steculorum, S. M., & Bouret, S. G. (2011a). Maternal diabetes compromises the organization of hypothalamic feeding circuits and impairs leptin sensitivity in offspring. *Endocrinology*, 152(11), 4171–4179. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1279>
- Steculorum, S. M., & Bouret, S. G. (2011b). *Maternal Diabetes Compromises the Organization of Hypothalamic Feeding Circuits and Impairs Leptin Sensitivity in Offspring*. 152(November), 4171–4179. <https://doi.org/10.1210/en.2011-1279>
- Stott, N. L., & Marino, J. S. (2020). *High Fat Rodent Models of Type 2 Diabetes : From Rodent to Human*.
- Sun, B., Purcell, R. H., Terrillion, C. E., Yan, J., Moran, T. H., & Tamashiro, K. L. K. (2012). Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes*, 61(11), 2833–2841. <https://doi.org/10.2337/db11-0957>
- Tamashiro, K. L. K., Terrillion, C. E., Hyun, J., Koenig, J. I., & Moran, T. H. (2009). Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes*, 58(5), 1116–1125. <https://doi.org/10.2337/db08-1129>
- Taylor, P. D., & Poston, L. (2005). *Developmental programming of obesity in mammals*. 287–298. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.032854>
- Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and

- energy homeostasis: Pathways to obesity. *DMM Disease Models and Mechanisms*, 10(6), 679–689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- Tsan, L., Décarie-Spain, L., Noble, E. E., & Kanoski, S. E. (2021). Western Diet Consumption During Development: Setting the Stage for Neurocognitive Dysfunction. *Frontiers in Neuroscience*, 15(February), 1–28. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.632312>
- Vickers, M. H., Clayton, Z. E., Yap, C., & Sloboda, D. M. (2011). Maternal fructose intake during pregnancy and lactation alters placental growth and leads to sex-specific changes in fetal and neonatal endocrine function. *Endocrinology*, 152(4), 1378–1387. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1093>
- Wen, L. M., Simpson, J. M., Baur, L. A., Rissel, C., & Flood, V. M. (2009). Family Functioning and Obesity Risk Behaviors: Implications for Early Obesity Intervention. *Obesity*, 19(6), 1252–1258. <https://doi.org/10.1038/oby.2010.285>
- Wetzler, S., Jean-Joseph, G., Even, P., Tomé, D., & Larue-Achagiotis, C. (2005). Acute third ventricular administration of leptin decreases protein and fat in self-selecting rats. *Behavioural Brain Research*, 159(1), 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2004.10.008>
- Whybrow, S., Mayer, C., Kirk, T. R., Mazlan, N., Stubbs, R. J., Terry, R., Mazlan, N. I. K., & Effects, R. J. S. (2007). Diet and Physical Activity Effects of Two Weeks 'Mandatory Snack Consumption on Energy Intake and Energy Balance. *Energy*, 15(3).
- Williams, L., Seki, Y., Vuguin, P. M., & Charron, M. J. (2014). Animal models of in utero exposure to a high fat diet: A review. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.006>
- Williams, Lyda, Seki, Y., Vuguin, P. M., & Charron, M. J. (2014). Biochimica et Biophysica Acta Animal models of in utero exposure to a high fat diet : A review ☆. *BBA - Molecular Basis of Disease*, 1842(3), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.07.006>
- Wilson, J. L., & Enriori, P. J. (2015). Molecular and Cellular Endocrinology A talk between fat tissue , gut , pancreas and brain to control body weight. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.022>
- Woodside, B., Budin, R., Wellman, M. K., & Abizaid, A. (2012). Many mouths to feed: The control of food intake during lactation. *Frontiers in Neuroendocrinology*,

33(3), 301–314. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2012.09.002>

Zeeni, N., Hani, C. D., & Wissam, D. (2015). Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. *Inflammation Research*, 64(7), 501–512. <https://doi.org/10.1007/s00011-015-0831-z>

Zeltser, L. M. (2018). feeding behaviour. *Nature Publishing Group*, 19(5), 302–316. <https://doi.org/10.1038/nrn.2018.23>

Zheng, H., & Berthoud, H. R. (2008). Neural systems controlling the drive to eat: Mind versus metabolism. *Physiology*, 23(2), 75–83. <https://doi.org/10.1152/physiol.00047.2007>

Biografia

Giovana Pereira de Oliveira, ingressou no curso de graduação em Ciências Biológicas no Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” no ano de 2014. No mesmo ano, participou como monitora e professora do cursinho Pré-Vestibular – IBB. Instituto de Biociências de Botucatu, IBB UNESP. Em 2015, iniciou sua trajetória na pesquisa como aluna de iniciação científica no Laboratório de Reprodução e Metabolismo (LabReM), sob orientação da Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss. Foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo 2015/26156-2) de 2016 à 2018, com os seguintes projetos: “Efeitos da infusão central aguda de diferentes doses de insulina na ingestão alimentar de ratos *Wistar* machos e fêmeas”; “Efeitos da infusão central crônica de insulina na ingestão alimentar de descendentes de ratas com hiperglicemia moderada”; “Efeitos da infusão central crônica de insulina no comportamento sexual e trato reprodutor de descendentes de ratas com hiperglicemia moderada”.

Em 2015, foi premiada em segundo lugar, na categoria oral, com o trabalho: "Efeito da infusão central aguda de diferentes doses de insulina na ingestão alimentar de ratos *Wistar* machos", no IV Congresso de Biociências, Instituto de Biociências de Botucatu, IBB UNESP. Em 2017, participou do 52º Curso de Verão em Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Em 2018, recebeu menção honrosa para o trabalho "Efeitos da infusão central de insulina na ingestão alimentar de descendentes de ratas com hiperglicemia moderada", na XVIII Jornada de Nutrição, UNESP Botucatu.

Em 2019, após obter o título de Licenciada e Bacharela em Ciências Biológicas, ingressou no curso de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Fisiologia Geral) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, também sob orientação da Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss, com bolsa FAPESP (Processo 2019/06974-3). Foi monitora no Curso de Férias “Reprodução de A a Z”, do programa de extensão universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na UNESP”, última experiência presencial realizada antes do início da pandemia de COVID-19. Participou como coautora do artigo: “Effects of snack intake during pregnancy and lactation on

reproductive outcome in mild hyperglycemic rats”, publicado na revista *Physiology and Behavior*.

Mesmo com o início da pandemia, deu continuidade aos experimentos do mestrado, cumprindo todas as recomendações necessárias, e apresentou dados parciais no 55° Congresso Anual SBFIS Online | Encontro Luso Brasileiro de Fisiologia | Symposium Miguel Covian | Latin American DOHaD Chapter, realizado no formato online. Apresentou os dados finais do projeto no Neuroscience | 50th Annual Meeting.

Certificado do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o projeto intitulado "Impacto da hiperglicemia e nutrição inadequada materna no controle da ingestão alimentar e reprodução dos descendentes", Protocolo nº 1134-CEUA, sob a responsabilidade de Ana Carolina Inhasz Kiss, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 9 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e sua prorrogação foi aprovada *Ad referendum* da **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS** (CEUA), nesta data.

Finalidade:	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto:	Início: 1/3/2019	Término: 01/09/2022
Espécie/linhagem:	<i>Rato Sprague dawley</i>	
Nº de animais:	455	
Peso:	120g	Idade: 45 dias
Sexo:	<i>Macho e fêmea</i>	
Origem	<i>Biotério de Produção de Ratos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo-USP CNPJ: 63.025.530/0005-38</i>	

Botucatu, 1º de junho de 2021.

Prof. Assoc. Luis Fernando Barbisan
Vice-Coordenador da CEUA

Solicitação de Alteração de Título



São Paulo, 15 de outubro de 2021.

Prezado Prof. Dr. Michael Hrnecir
Presidente da CCP da Fisiologia

Eu, Giovana Pereira de Oliveira, nº USP 11125473, aluna de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia do Instituto de Biociências, venho através deste solicitar alteração do título de dissertação de mestrado que será entregue brevemente. Este pedido se faz necessário, pois, durante a execução de meus experimentos, estava ocorrendo no laboratório um projeto financiado pela FAPESP, processo 2019/01306-2, intitulado "Impacto da hiperglicemia e nutrição inadequada materna no controle da ingestão alimentar dos descendentes". O modelo de associação de hiperglicemia e nutrição inadequada materna obteve bons resultados em projetos de outros alunos do laboratório que avaliaram outros aspectos dos descendentes. Aachamos, portanto, que seria interessante analisar também parâmetros metabólicos dos grupos experimentais nos quais ocorreram essa associação. Dessa maneira, houve a adição de uma nova variável em meu projeto (a nutrição materna inadequada), o qual, inicialmente, avaliaria somente os descendentes de mães hiperglicêmicas.

Assim, gostaria de solicitar a alteração do título que passará de "Efeitos da infusão central crônica de leptina na ingestão alimentar de descendentes de ratas com hiperglicemia moderada" para "Efeitos da leptina na ingestão alimentar de descendentes de ratas com alterações metabólicas e nutricionais" para melhor refletir o trabalho que desenvolvi no período.

Desde já agradeço a atenção concedida e solicito compreensão à situação excepcional.

Giovana Pereira de Oliveira (Nº USP 11125473)
Aluna de mestrado

De acordo,

Profa. Dra. Ana Carolina Inhasz Kiss
Orientador

