



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

# **Consequências do consumo materno de dieta de cafeteria sobre o perfil endócrino e a função reprodutiva da prole**

Tese de Doutorado

**Silvana Jacobs**

Porto Alegre, 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:  
FISIOLOGIA

# **Consequências do consumo materno de dieta de cafeteria sobre o perfil endócrino e a função reprodutiva da prole**

*Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências Biológicas: Fisiologia*

**Silvana Jacobs**

**Orientador: Prof. Dr. Gilberto Luiz Sanvitto**

Porto Alegre, 2013

*“Devemos julgar um homem mais pelas suas perguntas que pelas suas respostas”*

Voltaire

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelas fantásticas oportunidades, como esta, de importante construção intelectual. Mais do que isso, um importante período para o fortalecimento do meu caráter e da minha autoconfiança, para o constante exercício da paciência e da perseverança. Por ter me concedido boa saúde e disposição para a realização deste trabalho. Pelo suporte em todos os momentos. **Pai**: em ti confio!

Agradeço à minha **Família** pelo incentivo infinito e incondicional às minhas buscas (intelectuais, espirituais, existenciais...). Obrigada também por toda a paciência, compreensão e carinho. **Luiz, Altair, Kelly, Sandra, Dante, Thomás, Thaíz e Marco**. Através de vocês, tenho mais e mais certeza do quanto **Deus** me ama.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Gilberto Luiz Sanvitto**, sou imensamente grata pela confiança dispensada desde o meu ingresso nesta Instituição de Ensino. Por compartilhar conhecimentos, acompanhar o andamento dos trabalhos e estar sempre disposto a ajudar e a aconselhar.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. **Maria Flávia Marques Ribeiro**, por todas as formas de suporte. Pela amizade, apoio e sempre sábio aconselhamento nas mais diversas ocasiões.

Aos colegas de laboratório **Adolfo, Bruno, Cláudio Felipe, Kika, Deborah, Marcinha, Marcelo e Wagner**. É muito bom trabalhar com vocês! Obrigada por toda a amizade e parceria, dentro e fora do laboratório. As melhores pessoas que eu poderia ter ao meu lado durante essa jornada.

Ao Prof. Dr. **Celso Rodrigues Franci** pelas dosagens hormonais e apoio técnico.

Aos meus grandes amigos e apoiadores: **Branca Faresin, Luiza Falcão Funez e Márcio Marchiori**, por todas as injeções de ânimo entre tantas risadas! Por toda a paciência e compreensão dispensados nas minhas horas de necessária ausência.

Aos Professores **Aldo Bolten Lucion, Alex Sander Araújo, Adriane Belló-Klein, Ilma Brum, Luiz Carlos Kucharski, Wania Partata, Rosane Gomes e Patrícia Pelufo** por todas as formas de ensinamento, amizade e colaboração.

Aos demais funcionários do ICBS pelos diversos serviços prestados com absoluta atenção e competência. **Silvia, Alice e Cármen.**

Agradecimento importante ao **CNPq**, pelo apoio financeiro, o qual foi fundamental para a execução deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS	
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Obesidade .....	1
1.2 Modelos de obesidade: Dieta de Cafeteria (CAF).....	4
1.3 Obesidade e função reprodutiva em fêmeas: implicações na obesidade infantil ..	6
1.4 Comportamento maternal e obesidade na prole.....	11
1.5 Comportamento sexual e obesidade em machos.....	13
1.6 Angiotensina II e obesidade.....	17
1.7 Losartan.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1. Objetivo geral .....	22
2.2. Objetivos específicos.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Animais .....	23
3.2. Dietas.....	23
3.3 Grupos experimentais .....	25
3.3.1. Efeito do consumo de dieta de cafeteria administrada em diferentes períodos da reprodução sobre os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles.....	25
3.3.2.: Efeito da administração de Losartan associado ao consumo de dieta de cafeteria administrada em diferentes períodos da reprodução sobre os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles. ....	25
3.4. Tratamento com Losartan.....	26
3.5. Desenho experimental.....	26
3.6. Preparação dos ratos machos utilizados para observação do comportamento sexual e para a fertilização das ratas.....	27

3.7. Ciclo estral, comportamento sexual e fertilização das ratas .....	29
3.8. Comportamento Maternal .....	31
3.10. Coleta de sangue e de gordura abdominal .....	35
3.11. Dosagens hormonais.....	35
3.12. Análise estatística.....	36
3.13. Descarte de resíduos .....	37
4. RESULTADOS .....	38
4.1. Efeito do consumo de dieta de cafeteria em diferentes períodos sobre o desenvolvimento corporal e os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles.....	38
4.2. Efeito da associação da administração de Losartan com a dieta de cafeteria, consumida em diferentes períodos, sobre o desenvolvimento corporal e os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles. ....	63
5. DISCUSSÃO.....	88
6. CONCLUSÕES.....	121
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	124
8. ANEXOS .....	145
8.1. Artigo submetido à revista Physiology & Behavior intitulado “The impact of maternal consumption of cafeteria diet on the offspring reproductive function” .....	145

## RESUMO

A prevalência de sobrepeso e de obesidade constitui um sério problema de saúde mundial, abrangendo todas as faixas etárias, incluindo crianças. Neste aspecto, observa-se uma importante relação entre a obesidade materna e a obesidade infantil, a qual tende a persistir na idade adulta. Entretanto, ainda não está claro o impacto dos diferentes fatores que podem influenciar o desenvolvimento da obesidade infantil, tais como as modificações no ambiente intrauterino e no ambiente neonatal. A Angiotensina II (ang II) tem sido relacionada a alterações patológicas associadas à obesidade como hipertensão arterial sistêmica e diabetes mellitus tipo 2 (DM 2). O presente estudo analisou as consequências do consumo materno de dieta de cafeteria, ofertado em diferentes fases da reprodução, sobre aspectos endócrinos, metabólicos e reprodutivos da prole de ratas Wistar. Para isso, ratas foram alimentadas com ração padrão (grupo controle PAD) ou com dieta de cafeteria (grupo CAF) durante dez semanas a partir do desmame. No primeiro dia de gestação, estes grupos foram subdivididos: metade do grupo controle passou a receber dieta de cafeteria até o final da lactação (grupo PAD/CAF) e metade do grupo cafeteria passou a receber ração padrão até o final da lactação (grupo CAF/PAD). Após o desmame dos filhotes, foram analisados, nas mães, o peso corporal, o conteúdo de gordura abdominal, as concentrações plasmáticas de insulina, leptina, angiotensina II, prolactina, triglicérides, colesterol total e glicose. Na prole do sexo masculino, quando adultos, foram avaliados os mesmos parâmetros, acrescido de dosagens plasmáticas de LH, FSH e testosterona e da análise do comportamento sexual. Nas ratas, foi demonstrado que o consumo de dieta de cafeteria produziu aumento de peso corporal, de gordura abdominal, e das concentrações de insulina, leptina, ang II e triglicérides. Em associação, observamos aumento do cuidado maternal. Ao contrário, a suspensão da dieta durante a gestação/lactação reverteu estes efeitos (grupo CAF/PAD). As proles das ratas que consumiram dieta de cafeteria durante a gestação/lactação apresentaram, quando adultas, aumento do conteúdo de gordura abdominal, de insulina, de leptina e de triglicérides. Estes achados foram mais pronunciados na prole das ratas que receberam dieta de cafeteria desde o desmame até o final da lactação. Entretanto, foi observado que as proles de todas as ratas que, em algum momento foram expostas à dieta de cafeteria, apresentaram modificações nas concentrações dos hormônios reprodutivos, associado à inibição do comportamento sexual. O bloqueio dos receptores AT1 para ang II, através da administração de losartan na água de beber das mães dos 4 diferentes grupos, preveniu o aumento de gordura corporal e as demais alterações observadas com o consumo desta dieta. Também houve a normalização dos diferentes parâmetros do comportamento maternal. Deste modo, foram prevenidas as repercussões negativas da obesidade materna sobre a prole, de modo que os descendentes, quando adultos, não apresentaram o aumento de gordura abdominal e as demais alterações endócrinas e metabólicas previamente descritas. Ainda, houve a normalização dos diferentes parâmetros do comportamento sexual, em associação ao restabelecimento das concentrações fisiológicas dos hormônios reprodutivos. Os resultados deste estudo demonstram que o desencadeamento da obesidade infantil parece ser resultante do somatório de diferentes fatores, incluindo a obesidade materna e a modificação do ambiente neonatal, representado pelo aumento do cuidado maternal. Além disso, a administração do antagonista losartan em ratas submetidas à dieta de cafeteria a partir do desmame, previne a obesidade e suas modificações associadas. Consequentemente, é possível prevenir os diversos efeitos negativos observados nos seus descendentes.



## ABSTRACT

Overweight and obesity are a major public health problem all over the world, reaching all the age groups, including children. In this respect, it is noted an important relation between maternal and childhood obesity, tending to persist in adulthood. However it is not clear the impact of different factors influencing the development of childhood obesity, such as the changes in the intrauterine and neonatal environment. Angiotensin II (ang II) has been related to pathological alterations associated with obesity such as hypertension and type 2 diabetes mellitus (DM2). This study analyzed the consequences of the maternal consumption of cafeteria diet, offered in different phases of reproduction on endocrine, metabolic and reproductive aspects in the offspring of Wistar rats. For that, rats were fed standard chow (PAD control group) for 10 weeks since weaning. On the first day of gestation, the groups were subdivided: half of the control group was given cafeteria diet until the end of lactation (PAD/CAF group) and half of the cafeteria diet group was given standard chow until the end of lactation (CAF/PAD group). After pups weaning, it was analyzed the body weight, content of abdominal fat, plasma concentration of insulin, leptin, angiotensin II, prolactin, triglycerides, total cholesterol and glucose in mothers. In the male rat offspring, when adults, the same parameters plus plasma doses of LH, FSH and testosterone were evaluated as well as the sexual behavior. In female rats, it was demonstrated that the consumption of cafeteria diet produced increase of body weight, abdominal fat, and insulin, leptin, ang II and triglycerides concentrations, being also observed increase of maternal care. Offspring of female rats, which had fed cafeteria diet during gestation/lactation, presented, when adult, increase of abdominal fat content, insulin, leptin, and triglycerides. These findings were more pronounced in the offspring of female rats receiving cafeteria diet since weaning until the end of lactation. However, it was observed that the offspring of all the female rats, which at some moment had received cafeteria diet, presented modifications in the reproductive hormone concentrations, together with inhibition of sexual behavior. AngII AT1 receptor blockade, through Losartan administration in the drinking water of mothers in the four different groups, avoided the increase of body weight and the other alterations observed with the consumption of that diet. There was also normalization of different parameters of maternal behavior. Thus, it was prevented the negative repercussions of maternal obesity on the offspring, so that the descendants, when adults, did not present increase of abdominal fat and other endocrine and metabolic alterations previously described. Still, there was also the normalization of different parameters of sexual behavior in association with the restoration of physiological concentrations of reproductive hormones. The results of this study has shown that the onset of childhood obesity seems to be the result of the sum of different factors, including maternal obesity and the modification of neonatal environment, represented by the increase of maternal care. Furthermore, the administration of the antagonist Losartan in female rats submitted to cafeteria diet since weaning, prevents the obesity and its associated modifications. Consequently, it is possible to prevent many adverse negative effects observed in their descendants.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

### MATERIAIS E MÉTODOS

<b>Tabela 1:</b> Conteúdo nutricional da ração padrão e dos alimentos ofertados na dieta de cafeteria.....	24
<b>Tabela 2:</b> Planilha de registro do comportamento maternal.....	32
<b>Figura 1:</b> Resumo esquemático do desenho experimental.....	27
<b>Figura 2:</b> Descrição visual dos comportamentos de lordose da fêmea (A) e monta do macho (B) durante o registro de comportamento sexual.....	30
<b>Figura 3:</b> Principais comportamentos maternos analisados: (a) postura de amamentação com o dorso muito arqueado; (b) postura de amamentação com o dorso pouco arqueado; (c) postura de amamentação passiva (supino) e (d) comportamento de lambe os filhotes.....	33

### RESULTADOS

<b>Tabela 3:</b> Comportamento sexual da prole dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	62
<b>Tabela 4:</b> Comportamento sexual da prole dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF +LOS, CAF/CAF, CAF/CAF +LOS, CAF/PAD E CAF/PAD + LOS.....	87
<b>Figura 4:</b> Efeito da dieta de cafeteria a partir do desmame sobre a evolução do peso corporal ao longo de 10 semanas de experimento das ratas dos grupos PAD e CAF.....	39
<b>Figura 5:</b> Peso corporal aos 21 dias de vida (A) e aos 90 dias de vida (B) das ratas dos grupos PAD e CAF.....	39
<b>Figura 6:</b> Efeito da dieta de cafeteria a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses/ número de montas) de ratas dos grupos PAD e CAF.....	40
<b>Figura 7:</b> Efeito da dieta de cafeteria a partir do 1º dia de gestação sobre a evolução do peso corporal de ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	41
<b>Figura 8:</b> Peso corporal no final da gestação das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	42
<b>Figura 9:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre o percentual de ganho de peso durante a gestação nas ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	42
<b>Figura 10:</b> Média no número de filhotes por ninhada, nascidos das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	43
<b>Figura 11:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a média do peso das ninhadas no 1º (A) e no 10º dia pós-natal (B) nascidas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD .....	44
<b>Figura 12:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a frequência total dos comportamentos de amamentação (A), de lambida (B) e de permanência no ninho (C) durante 10 dias nas ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	45
<b>Figura 13:</b> Efeito dieta de cafeteria sobre o peso corporal (A) e sobre a gordura abdominal (B) dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	46
<b>Figura 14:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de insulina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF CAF/CAF e CAF/PAD.....	47

<b>Figura 15:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de leptina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	47
<b>Figura 16:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de ang II 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	48
<b>Figura 17:</b> Correlação entre gordura abdominal e concentração plasmática de insulina (A), de leptina (B) e de ang II (C) entre as ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	49
<b>Figura 18:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de (A) glicose, (B) colesterol total e (C) triglicerídeos, 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD .....	50
<b>Figura 19:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de prolactina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	51
<b>Figura 20:</b> Efeito da dieta materna sobre o ganho de peso corporal dos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	52
<b>Figura 21:</b> Efeito da dieta materna sobre peso corporal ao desmame (A) e aos 90 dias (B) dos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF, e CAF/PAD.....	53
<b>Figura 22:</b> Efeito da dieta materna sobre o consumo de ração padrão total por animal, desde o desmame até os 90 dias de vida, dos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	54
<b>Figura 23:</b> Efeito da dieta materna sobre o conteúdo de gordura abdominal nos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF, e CAF/PAD .....	54
<b>Figura 24:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de insulina nos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF CAF/CAF e CAF/PAD .....	55
<b>Figura 25:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de leptina nos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	55
<b>Figura 26:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de angiotensina II nos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD .....	56
<b>Figura 27:</b> Correlação entre gordura abdominal e concentração plasmática de insulina (A), de leptina (B) e de ang II (C) entre as ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD .....	57
<b>Figura 28:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de (A) glicose, (B) colesterol total e (C) triglicerídeos de jejum nos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF, e CAF/PAD.....	59
<b>Figura 29:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de testosterona nos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	29
<b>Figura 30:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de prolactina nos descendentes dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD.....	30
<b>Figura 31:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de FSH nos descendentes machos dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD....	30
<b>Figura 32:</b> Efeito da administração de Losartan associado ao consumo de dieta de cafeteria sobre a evolução do peso corporal ao longo de 10 semanas nos grupos PAD+LOS e CAF+LOS comparados aos grupos PAD e CAF do Experimento 1.....	64
<b>Figura 33:</b> Peso corporal aos 21 dias de vida (A) e aos 90 dias de vida (B) dos grupos PAD, PAD+LOS, CAF e CAF+LOS.....	65

<b>Figura 34:</b> Efeito da dieta de cafeteria a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses/ número de montas) de ratas Wistar adultas dos grupos PAD, PAD+LOS, CAF e CAF+LOS.....	65
<b>Figura 35:</b> Peso corporal no final da gestação dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	66
<b>Figura 36:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre o percentual de ganho de peso corporal durante a gestação nas ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	67
<b>Figura 37:</b> Média no número de filhotes por ninhada, nascidos das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	67
<b>Figura 38:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a média do peso das ninhadas no 1º (A) e no 10º dia pós-natal (B) nascidas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS .....	68
<b>Figura 39:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a frequência total do comportamento de amamentação (A), lambida (B) e permanência no ninho (C) durante 10 dias nos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	70
<b>Figura 40:</b> Efeito dieta de cafeteria sobre o peso corporal (A) e sobre a gordura abdominal (B) dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS .....	71
<b>Figura 41:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de insulina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	72
<b>Figura 42:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de leptina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS .....	73
<b>Figura 43:</b> A- Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de (A) glicose, (B) colesterol total e (C) trilicerídeos, 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	74
<b>Figura 44:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de ang II 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	75
<b>Figura 45:</b> Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de prolactina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD+LOS, PAD/CAF, PAD/CAF+LOS, CAF/CAF, CAF/CAF+LOS, CAF/PAD e CAF/PAD+LOS.....	76
<b>Figura 46:</b> Efeito da dieta materna sobre o peso corporal ao desmame (A) e aos 90 dias de vida (B), dos descendentes das ratas dos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS.....	77
<b>Figura 47:</b> Efeito da dieta materna sobre o consumo de ração padrão total por animal, desde o desmame até os 90 dias de vida, dos descendentes dos grupos	

PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS.....	78
<b>Figura 48:</b> Efeito da dieta materna sobre o acúmulo de gordura abdominal nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD, e CAF/PAD + LOS.....	79
<b>Figura 49:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de insulina nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS.....	80
<b>Figura 50:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de leptina nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS.....	81
<b>Figura 51:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de (A) glicose, (B) colesterol total e (C) triglicérides nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CA, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS.....	82
<b>Figura 52:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de ang II nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS.....	83
<b>Figura 53:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de testosterona nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS.....	84
<b>Figura 54:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de prolactina nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD, e CAF/PAD + LOS.....	85
<b>Figura 55:</b> Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de FSH nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF, CAF/CAF + LOS, CAF/PAD, e CAF/PAD + LOS.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AMe – Amígdala medial
- Ang II – Angiotensina II
- APOM – Área pré-óptica medial
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do encéfalo
- CAF – Dieta de Cafeteria
- DM 2 – Diabetes Mellitus tipo 2
- DPN – Dia pós-natal
- ECA – Enzima conversora de angiotensina
- FSH – Hormônio Folículo-Estimulante
- GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas
- HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica
- HFD – High-fat diet
- IMC – Índice de Massa Corporal
- IOM – Institute of Medicine
- LH- Hormônio luteinizante
- PRL – Prolactina
- RAS – Sistema renina-angiotensina
- SHBG – Globulina ligadora de hormônios sexuais
- SOPC – Síndrome dos ovários policísticos
- vBST – Leito ventral da *stria terminalis*
- VMH – Núcleo ventromedial
- WHO – World Health Organization

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Obesidade

A obesidade é uma doença caracterizada por um acúmulo excessivo de tecido adiposo (WHO, 2007), resultante de um desequilíbrio no balanço energético, em que a ingestão se sobrepõe ao gasto de energia (Spegelman & Flier, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde (1998), o conteúdo de tecido adiposo que caracteriza a obesidade pode ser avaliado de forma indireta em indivíduos adultos por meio do Índice de Massa Corporal (IMC), um indicador que utiliza o peso corporal em quilogramas dividido pelo quadrado da altura. Em adultos, um IMC igual ou superior a  $30\text{kg/m}^2$  caracteriza o indivíduo como obeso. Por outro lado, pessoas que apresentam IMC entre 18,5 e  $24,9\text{kg/m}^2$  e dentro do intervalo de  $25\text{-}29,9\text{kg/m}^2$  são consideradas saudáveis e com sobrepeso, respectivamente.

O sobrepeso e a obesidade constituem um importante problema de saúde pública e vêm assumindo características epidêmicas (Wei *et al.*, 2009). Em 2007, a Organização Mundial da Saúde já indicava que a incidência mundial de sobrepeso em adultos estava acima de 1 bilhão de indivíduos, dentre os quais pelo menos 400 milhões eram considerados obesos. No Brasil, de acordo com o último levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2012), a proporção de pessoas acima do peso avançou de 42,7% em 2006 para 48,5% em 2011. No mesmo período, o percentual de obesos subiu de 11,4 % para 15,8%. Por tratar-se de uma doença de etiologia multifatorial, as causas desta epidemia estão sendo exaustivamente estudadas por diversos grupos de pesquisa em todo o mundo.

O grande número de casos de obesidade parece ser o resultado de mudanças nos alimentos, nos hábitos alimentares e nos níveis de atividade física. Estudos indicam que, desde 1970, a indústria alimentícia vem realizando modificações nos alimentos, resultando no aumento gradativo nos tamanhos das porções de alimentos comercializados em supermercados, “fast-foods” e restaurantes (Young & Nestlem 2002). Esse aumento no tamanho das porções também foi acompanhado por um aumento no consumo de alimentos e ingestão energética em casa, restaurantes e “fast-foods” no mesmo período (Nielsen *et al.*, 2002). A maior frequência de realização das refeições em “fast-foods” tem sido associada com maiores níveis de IMC e com o risco de ganho de peso em adultos (Schröder *et al.*, 2007; Pereira *et al.*, 2005). Esse tipo de alimentação é caracterizada por baixo consumo de frutas, cereais e vegetais (Bowman *et al.*, 2004; Schröder *et al.*, 2007), de modo que aqueles que se alimentam em “fast-foods” apresentam uma maior ingestão de lipídios, gordura saturada, carboidratos totais, carboidratos refinados e sódio, contidos em carnes, batata frita e refrigerantes (Bowman *et al.*, 2004). O refrigerante passou a ser a bebida que mais contribui para a ingestão energética total. Em 1977, o consumo de refrigerante pela população norte-americana representava 2,8% da ingestão energética total, enquanto que em 2001 passou a representar 7% (Nielsen & Popkin, 2004). Além disso, o consumo de refrigerante parece estar relacionado com a mudança nas escolhas alimentares, associando-se ao aumento do consumo de alimentos industrializados e a uma redução da ingestão de frutas, vegetais, grãos, peixes e frutos do mar, arroz, ovos e batata (Yamada *et al.*, 2008).

As modificações na sociedade moderna que tiveram início na metade do século XX também parecem ter contribuído para os menores níveis de atividade



física e para o comportamento sedentário, o que parece estar intimamente relacionado ao desenvolvimento de sobrepeso e obesidade. Nos Estados Unidos, por exemplo, um estudo de Brownson e colaboradores (2005) indicou que existem mais carros do que motoristas licenciados e que 86% dos percursos urbanos eram realizados de carro e somente 8,6% eram realizados a pé. Ainda, a análise prospectiva das participantes do Nurse's Health Study mostrou que o aumento em 2 horas por dia no tempo assistindo televisão aumentou em 23% o risco de desenvolver obesidade em mulheres (Hu *et al.*, 2003).

O aumento do peso corporal pode aumentar os fatores de risco para o desenvolvimento de graves problemas de saúde, tais como doenças cardiovasculares, hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Vassan, 2001), resistência à insulina, diabetes não-dependente de insulina (Diabetes Mellitus tipo 2; DM2) (Chan *et al.*, 1994), diversos tipos de câncer (Flegal *et al.*, 2007) e diversos distúrbios metabólicos (Mayes & Watson, 2004), podendo conduzir o indivíduo obeso a uma redução da qualidade e da expectativa de vida (Hill & Petters, 1998). A hiperinsulinemia de jejum observada na resistência à insulina e no DM2 em indivíduos obesos pode ocasionar um perfil lipídico desfavorável, como o aumento das concentrações séricas de triglicérides, do colesterol LDL e a diminuição do colesterol HDL (Rajkhowa *et al.*, 1997). Além disso, em humanos e roedores a sobrecarga de lipídios pode destruir as células  $\beta$ -pancreáticas (Lee *et al.*, 2007). Recentemente, a presença de obesidade central ou IMC  $> 30\text{kg/m}^2$  como condição essencial, e dois ou mais dos seguintes critérios: hipertrigliceridemia, HDL-C baixo, HAS e glicemia de jejum alterada ou diagnóstico prévio de DM2, tem sido caracterizada como síndrome metabólica, um fator de risco para doenças

cardiovasculares, DM2 (Alberti *et al.*, 2006) e esteatose hepática não-alcoólica (Watanabe *et al.*, 2008).

O DM2 merece importante atenção neste contexto, pois sua incidência global está estimada em 350 milhões de casos para 2030, sendo que em 2007 os gastos com o manejo da doença nos EUA foram de 174 bilhões de dólares (Wild *et al.*, 2004; ADA, 2010). Um evento crítico no curso do desenvolvimento do DM2 está relacionado com a obesidade: a resistência insulínica, a qual se correlaciona ao peso corporal tanto em humanos quanto em outros animais, uma vez que a perda e o ganho de peso estão associados com a diminuição e o aumento da resistência à insulina, respectivamente (Freidenberg *et al.*, 1988). Parte da resistência insulínica observada na obesidade parece ser o resultado da menor captação de glicose nos adipócitos (Garcia-Diaz *et al.*, 2011), assim como no músculo esquelético (Freidenberg *et al.*, 1988). Em indivíduos com resistência à insulina que ainda não progrediram para o DM2, a manutenção das concentrações plasmáticas de glicose de jejum dentro das faixas normais é obtida por um aumento compensatório na secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, o que parece contribuir para a falência da glândula e para o estabelecimento do quadro de DM2 (Kahn, 2003; Butler *et al.*, 2003).

## 1.2 Modelos de obesidade: Dieta de Cafeteria (CAF).

Ao longo do tempo, a obesidade vem sendo estudada através de modelos experimentais animais com a finalidade de esclarecer os mecanismos envolvidos na regulação do peso corporal e, posteriormente, nas doenças relacionadas ao seu excesso. Entre os principais modelos de obesidade, se destacam os provocados por lesões em áreas hipotalâmicas envolvidas no controle da saciedade como o núcleo

ventromedial (VMH) (Shimizu *et al.*, 2003) e a obesidade com origem genética em ratos e camundongos (Zhang *et al.*, 2004). Modelos denominados “high-fat diet” (HFD) utilizam ração modificada contendo alta concentração de lipídios e alta densidade energética quando comparados à ração padrão de biotério, resultando em animais obesos por aumento de ingestão energética (Shafat *et al.*, 2009; Kennedy *et al.*, 2011).

Apesar de todos os modelos experimentais supracitados reproduzirem um aspecto importante da obesidade e da resistência à insulina, a dieta de cafeteria (CAF), podendo também ser denominada dieta “ocidentalizada”, ou de “fast-food”, consiste em um modelo animal de obesidade que reflete, de forma mais aproximada, a variedade de alimentos altamente palatáveis, densos em energia, ricos em sódio e gordura saturada e pobre em fibras que prevalecem como padrão alimentar em muitos países e cujo consumo está associado à epidemia de obesidade (Prada *et al.*, 2005; Kretschmer *et al.*, 2005; Cesareti & Kohlmann Jr, 2006). Os alimentos empregados em adição à ração padrão de biotério no modelo de dieta de cafeteria variam entre os estudos, mas observa-se comumente o emprego de pão branco, salame, queijo, chocolate, gordura animal, cubos de açúcar, refrigerante, marshmallow, pipoca, presunto, entre outros (Shafat *et al.*, 2009). Entre as conseqüências do acesso *ad libitum* a esses alimentos estão um padrão alimentar hiperfágico e hipercalórico pelo maior consumo de gorduras e carboidratos (Shafat *et al.*, 2009), ganho de peso corporal, aumento significativo na quantidade de gordura visceral, elevação da pressão arterial e resistência à insulina (Wofford & Hall, 2004). A simples introdução da dieta de cafeteria, mesmo sem alteração no peso corporal, determina alterações no metabolismo glicídico, lipídico e na função endotelial (Nadareli *et al.*, 2001). A dieta de cafeteria também leva a um aumento da

concentração sanguínea de leptina e insulina em ratos (Chaves *et al.*, 2006), produz adaptações fisiológicas que resultam na redução da sensibilidade aos efeitos anorexígenos da leptina (Levin & Dunn-Meynell, 2002; Levin *et al.*, 2004) e redução da sinalização central da insulina (Clegg *et al.*, 2003). Em conjunto, esses dados demonstram que a dieta de cafeteria é um modelo robusto e confiável para a indução de obesidade e síndrome metabólica em ratos (Sampey *et al.*, 2011).

### 1.3 Obesidade e função reprodutiva em fêmeas: implicações na obesidade infantil

No passado, estudos realizados em ratas (Kennedy & Mitra, 1963) e em mulheres (Frish, 1987) demonstraram que uma quantidade mínima de gordura corporal é necessária para o início e manutenção dos ciclos ovulatórios. De fato, meninas excessivamente magras comumente apresentam atrasos na menarca e amenorréia (Golden & Shenker, 1994). No outro extremo, o excesso de gordura corporal também parece interferir negativamente na função reprodutiva, pois observações clínicas têm sugerido há muito tempo que existe uma forte relação entre a adiposidade e a infertilidade feminina (Bolumar *et al.*, 2000; Pasquali *et al.*, 2003). Mitchel & Rogers (1953) demonstraram que 43% das mulheres afetadas por desordens menstruais, infertilidade e abortos espontâneos apresentavam sobrepeso ou eram obesas. Em estudos de associação de vários fatores, mulheres obesas são mais propensas a apresentarem irregularidades menstruais do que mulheres de peso normal (Wei *et al.*, 2009). O excesso de gordura corporal aumenta a disfunção ovulatória, e a síndrome dos ovários policísticos (SOPC), caracterizada por sintomas ginecológicos e endócrinos, apresenta maior prevalência em mulheres obesas (Rittmaster *et al.*, 1993; Pasquali *et al.*, 2003), sendo que a história de ganho de peso

frequentemente precede o início da oligomenorréia e do hiperandrogenismo (The Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group, 2004). A obesidade também afeta o endométrio, a implantação e o desenvolvimento fetal (Kaads *et al.*, 2002; Hall & Neubert, 2005). Alguns estudos demonstram ainda redução no número de gestações em mulheres obesas (Lindsten *et al.*, 2005).

O avanço nas pesquisas que relacionam a obesidade às alterações na função reprodutiva conduziu o foco dos estudos a outro aspecto que tem ganhado atenção: o aumento da prevalência de obesidade infantil (Nathan & Moran, 2008). Dados apresentados no período de 2007-2008 pelo National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) demonstraram que 17,6% das crianças e adolescentes entre 2-19 anos estavam obesos nos Estados Unidos (Ogden *et al.*, 2007). Por meio de uma pesquisa de Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística realizada entre 2008-2009 (IBGE, 2010), o excesso de peso foi observado em 33,5% das crianças entre 5-9 anos, sendo que 16,6% dos meninos eram obesos e entre as meninas, a obesidade foi de 11,8%. Fatores de risco à doença coronária como dislipidemia, hipertensão e reduzida tolerância à glicose têm sido descritas em crianças obesas, com sintomas similares aos observados em indivíduos adultos (Dietz, 1994). Adicionalmente aos efeitos deletérios da obesidade, os reflexos desses efeitos na vida adulta também têm sido verificados. De fato, a sobrenutrição precoce induz o desenvolvimento de patologias na idade adulta, incluindo a resistência à insulina (Martins *et al.*, 2008), doenças cardiovasculares e o DM2 (Barker, 2007). Além disso, a obesidade e a síndrome metabólica promovem um aumento precoce da capacidade adipogênica e lipogênica dos adipócitos (Muhlhausler & Smith 2009).

Em 2001, Pimenta & Palma enunciaram: “*Não se sabe com precisão se a obesidade tem origem em fatores genéticos ou ambientais. Acredita-se que seja devida a ambos os fatores. É difícil afirmar que uma criança é obesa, porque seus pais também são obesos, quando toda a família possui hábitos inadequados em relação à dieta e ao exercício físico*”.

Enquanto as mudanças no estilo de vida - caracterizadas por baixa atividade física e pelo aumento da ingestão de alimentos densos em energia – são apontadas como as principais causas da epidemia mundial de obesidade, evidências de estudos em humanos e em animais têm sugerido que alguns eventos ocorridos nos estágios iniciais da vida também podem “programar” a síndrome metabólica nos descendentes de mães obesas (McMillen & Robinson, 2005; Taylor & Poston, 2007). Isso quer dizer que, além das influências ambientais no período pós-natal e da susceptibilidade genética como fatores comuns de predisposição à obesidade (Lawlor *et al.*, 2008), a maior influência do IMC materno do que do IMC paterno sobre o IMC das crianças observada em estudos realizados em humanos, pode indicar uma importante e independente influência do ambiente intrauterino sobre a adiposidade da prole (Blair *et al.*, 2007), apontando finalmente para a obesidade materna como um fator de risco para o desenvolvimento de síndrome metabólica e obesidade na infância (Hill & Peters, 1998). Filhos de mães obesas também apresentam um risco aumentado de terem um IMC mais elevado quando adultos (Parsons *et al.*, 2001).

Do mesmo modo que a prevalência mundial de obesidade tem crescido, mais mulheres têm iniciado a gestação com sobrepeso e obesidade (Zhang *et al.*, 2011). A incidência de mulheres entre 20 e 39 anos que engravidam com sobrepeso e obesidade cresceu de 25% para 35% entre 1991 e 2001 nos EUA. No momento do

parto, esse percentual aumentou de 29% para 39% no mesmo período (La Coursiere *et al.*, 2001). Uma recente afirmação científica do American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention incluiu um resumo das evidências dos determinantes pré-natais da obesidade e destacou que *“a obesidade entre meninas e mulheres em idade fértil está produzindo um concomitante aumento nas taxas de diabetes gestacional, que por sua vez pode conduzir à obesidade na próxima geração. Este círculo vicioso pode contribuir para a epidemia de obesidade pelas próximas décadas”* (Kumanyika *et al.*, 2008).

Mulheres obesas apresentam um risco aumentado de complicações na gestação, incluindo hipertensão, pré-eclâmpsia, fetos grandes para a idade gestacional (macrossomia), aumento nas taxas de cesariana e diabetes gestacional (Nohr *et al.*, 2008). O diabetes gestacional, intimamente associado à obesidade materna, também tem sido implicado no desenvolvimento de obesidade da prole (Hillier *et al.*, 2007). O aumento das concentrações de glicose e de aminoácidos da mãe estimula o pâncreas fetal a secretar quantidades exageradas de insulina e o fígado fetal a produzir níveis mais elevados de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). A hiperinsulinemia fetal estimula o crescimento de tecido adiposo no feto e de outros tecidos sensíveis à insulina, frequentemente induzindo a macrossomia. Portanto, os descendentes de mães com diabetes gestacional frequentemente têm um maior peso ao nascimento e aumento de tecido adiposo em relação à massa magra corporal (Catalano *et al.*, 2003). Esse aumento relativo na adiposidade predispõe o descendente da mãe com diabetes gestacional ao desencadeamento de obesidade durante o desenvolvimento (Simmons, 2008).

Reforçando resultados obtidos em humanos, diversas pesquisas em animais também têm indicado uma estreita relação entre a obesidade materna e a

consequente obesidade da prole. Uma dieta materna hiperlipídica durante a gestação e a lactação induz o desenvolvimento de uma prole com um fenótipo alterado, caracterizado por síndrome metabólica, mesmo quando esses filhotes são alimentados com uma dieta padrão (ração) para animais de laboratório (Armitage *et al.*, 2005; Férézou-Viala *et al.*, 2007). O consumo materno de dieta de cafeteria produz efeitos semelhantes sobre a prole, resultando em animais hiperfágicos, obesos e resistentes à insulina (Nivoit *et al.*, 2009). Além disso, estudos realizados em animais indicam que a prole de fêmeas obesas apresenta anormalidades no desenvolvimento dos circuitos neurais, alterações na sinalização de dopamina central e na produção de fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), redução da capacidade de aprendizado espacial, redução na neurogênese hipocampal e aumento na sinalização inflamatória e no estresse oxidativo cortical (Bilbo & Tsang, 2010; Tozuka *et al.*, 2010; White *et al.*, 2010, Geiger, 2010). Crianças que foram expostas a um ambiente intrauterino modificado pela obesidade materna têm um risco aumentado para o desenvolvimento de desordens como hiperatividade, déficit de atenção e pouco controle emocional (Rodriguez, 2010).

O ganho de peso durante a gestação também parece ter efeitos nocivos no desfecho da gestação (Oken *et al.*, 2009), havendo uma moderada associação entre o ganho de peso materno e a incidência de partos por cesariana (Siega-Riz *et al.*, 2009), segundo as diretrizes do Institute of Medicine (IOM - EUA) para ganho de peso durante a gestação em mulheres com baixo peso, peso normal, sobrepeso e obesidade (Rasmussen & Yaktine, 2009). Isto conduz o foco para a saúde nutricional da mulher antes da gravidez, bem como para a aplicação de intervenções que possam reduzir o peso das mulheres obesas e com sobrepeso durante o período pré-gestacional, a fim de melhorar a qualidade da futura gestação. Para as



mulheres que iniciam a gestação com sobrepeso ou obesidade, ou ainda as que exibem um ganho de peso exacerbado durante a gestação. Porém, as intervenções para redução de peso corporal em mulheres durante a gestação devem ser seguras ao considerar os riscos e benefícios da restrição calórica materna sobre o desenvolvimento fetal (Zhang *et al.*, 2011).

Dado esse conjunto de informações, há a necessidade de melhor entendermos as contribuições independentes ou inter-relacionadas da obesidade materna no período pré-gestacional, do ganho de peso durante a gestação, ou de abordagens de controle do peso corporal na gestação sobre os desfechos metabólicos e reprodutivos, bem como do desenvolvimento da prole.

#### 1.4 Comportamento maternal e obesidade na prole

Além das influências intrauterinas exercidas pela dieta materna, as características do ambiente neonatal também parecem desempenhar um papel-chave no desenvolvimento da obesidade da prole. Porém, ainda não está claro o papel do comportamento maternal neste aspecto (Gorski *et al.*, 2006).

Roedores são relativamente imaturos ao nascimento e sua sobrevivência depende da capacidade e disponibilidade de suas mães em lhes prover alimento, calor, abrigo e proteção contra predadores (Numan *et al.*, 2006), particularmente durante as duas primeiras semanas de vida (Purcell *et al.*, 2011). O cuidado maternal também representa uma fonte essencial de estimulação sensorial durante o período neonatal, o qual contribui para a maturação das vias neurais (Levine, 2000), de modo que modificações nas características do ambiente neonatal e da relação mãe-filhote podem induzir diversas alterações no desenvolvimento dos filhotes, influenciando suas respostas neuroendócrinas e comportamentais a curto e a longo

prazo (Pryce *et al.*, 2001; Levine, 2000), além de exercer influências sobre aspectos emocionais e cognitivos (Kaffman & Meaney, 2007).

O comportamento maternal é definido como uma série de ações da mãe que se manifestam próximo ao dia do parto e imediatamente após o nascimento dos filhotes, entre as quais se distinguem quatro principais: amamentação, lambidas, recolhimento dos filhotes e construção do ninho (Numan & Insel, 2003). A regulação do comportamento maternal está sob influências multifatoriais, que incluem tanto o estímulo dado pela presença dos filhotes, como por fatores hormonais da rata lactante (Numan, 2006). Neste aspecto, a prolactina (PRL), secretada pelos lactotrofos hipofisários, é um hormônio que tem uma importante participação no início e na manutenção da lactação e no comportamento maternal como um todo (Bridges *et al.*, 1985; Sacaguchi *et al.*, 1996), e sabe-se que a sucção dos mamilos é um dos estímulos fisiológicos mais importantes para a elevação da PRL hipofisária (Grosvenor *et al.*, 1986). A área pré-óptica medial (APOM), localizada no hipotálamo rostral, juntamente com a porção ventral do leito da *stria terminalis* (vBST), originam os circuitos neurais que regulam a motivação maternal (Numan, 2006). A APOM é um importante sítio de ação da PRL para estimular o comportamento maternal, de modo que infusões intracerebroventriculares de PRL nesta região levam a um rápido início do cuidado maternal em ratas nulíparas, na presença de filhotes (Walsh *et al.*, 1987). De forma contrária, danos nesta região produzem perturbações no comportamento maternal (Numan & Insel, 2003).

Considerando que o comportamento da mãe também pode ser influenciado direta e indiretamente pelo meio (Champagne *et al.*, 2003), foi observado que o estado nutricional, tanto da mãe como do filhote, também desempenha um importante papel na determinação da interação mãe-filhote. Ratas

mantidas em uma dieta com baixo conteúdo de proteínas são menos responsivas aos filhotes (Wiener et al, 1976). Por outro lado, experimentos realizados com ratas alimentadas com dieta hiperlipídica durante a prenhez e lactação mostraram resultados contraditórios, ora com redução (Connor et al, 2012), ora com aumento de cuidado maternal (Purcell *et al.*, 2011).

A lactação parece desempenhar um papel crítico na programação da obesidade da prole, já que nas primeiras semanas de vida o leite é o alimento exclusivo do neonato (Drewet *et al.*, 1974). Além do tempo que a mãe disponibiliza para amamentar, um aspecto muito importante a ser considerado é a composição do leite materno. Ao analisar a composição do leite de ratas lactantes, alimentadas com dieta hiperlipídica, Purcell e colaboradores (2011) observaram um aumento no conteúdo de gordura, proteína e conteúdo calórico bruto, diminuição do conteúdo de água, não havendo diferença no conteúdo de açúcares, quando comparado aos animais alimentados com ração padrão. Esses dados apontam claramente a influência da dieta materna sobre a composição do leite ofertado à prole, incluindo a dieta de cafeteria (Rolls & Gurr, 1986), sugerindo que este também pode ser um importante aspecto contribuinte para o ganho de peso corporal precocemente observado nos descendentes de mães obesas.

### 1.5 Comportamento sexual e obesidade em machos

O comportamento sexual dos machos é definido como todo comportamento necessário e suficiente para levar os espermatozoides até o ovócito e, para tanto, conta com a integridade dos sistemas endócrino e neural (Nelson, 1995; Agmo, 1997). Considera-se que o comportamento sexual representa a expressão da função reprodutiva do indivíduo e, de um modo geral, compreende

duas fases: a apetitiva e a consumatória. A fase apetitiva representa a aproximação entre macho e fêmea e envolve todos os comportamentos utilizados pelo rato para atrair a fêmea: procura pela fêmea, cheirar os genitais da fêmea, vocalizações. A fase consumatória refere-se ao período em que ocorre a cópula propriamente dita e a ejaculação (Nelson, 1995).

Nos roedores, o comportamento sexual pode ser dividido em três componentes: monta (sem intromissão), intromissão e ejaculação. Medidas do comportamento pré-copulatório do macho servem para indicar a motivação sexual. A latência de monta é o período de tempo do contato inicial entre o macho e a fêmea até a primeira monta. Assim, a motivação sexual é considerada alta se a latência da monta for curta e vice-versa (Nelson, 1995; Chan *et al.*, 1999). A monta ocorre quando o macho assume a posição copulatória, mas falha em inserir seu pênis na vagina da fêmea (Nelson, 1995). A intromissão pode ser definida como a entrada do pênis na vagina durante uma monta. O macho realiza um movimento da pelve direcionando-a para frente ao contato com a fêmea. A quantificação do número de intromissões, bem como a latência da primeira intromissão também serve como medida do comportamento sexual dos machos, estando mais relacionado com o potencial erétil (Chan *et al.*, 1999).

O controle do comportamento sexual envolve uma complexa rede de rotas neurais, abrangendo diferentes áreas do sistema nervoso. Neste aspecto, há evidências indicando a participação indispensável da APOM no comportamento copulatório, enquanto a amígdala medial (AMe) teria uma importância mais vinculada ao aspecto motor desse comportamento (Wood, 1997), sendo necessária a preservação dessas áreas e de suas vias neurais para a integridade do comportamento sexual (Kondo & Arai, 1995). Estudos indicam que a lesão da APOM

prejudica a motivação sexual dos machos em diferentes contextos, como a perseguição da fêmea (Paredes *et al.*, 1993). Por outro lado, a estimulação da APOM facilita o comportamento copulatório (Rodriguez-Manzo *et al.*, 2000).

No hipotálamo de roedores, o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) é secretado pelos neurônios da área pré-óptica medial (APOM), os quais se projetam para a eminência mediana (EM) liberando seus produtos nos capilares do sistema porta-hipofisário, que os conduzem até a hipófise anterior (Hiney *et al.*, 2002). Sob o estímulo do GnRH, os gonadotrofos da hipófise anterior promovem a liberação do hormônio luteinizante (LH) e do hormônio folículo-estimulante (FSH). O LH e o FSH são importantes para o desenvolvimento e função sexual. Nos machos, o LH estimula as células de Leydig nos testículos a produzir testosterona e o FSH participa da maturação das células espermáticas no testículo (Berne & Levy, 2009). A testosterona possui ação no desencadeamento e no desenvolvimento dos caracteres sexuais masculinos e também atua na diferenciação sexual do SNC, determinando fatores morfológicos e comportamentais específicos do macho (Babichev *et al.*, 1990; Bialek *et al.*, 2004). Os efeitos centrais da testosterona são mediados, pelo menos em parte, pelos receptores androgênicos (McGinnes & Dreifuss, 1989), os quais estão localizados em áreas importantes para a regulação do comportamento sexual, como a APOM e o núcleo ventromedial do hipotálamo (VMH) (Harding & McGinnis, 2003). Outro hormônio que exerce destacado efeito sobre a liberação de gonadotrofinas e a função reprodutiva é a prolactina (PRL). Este hormônio é sintetizado pela hipófise anterior, nos lactotrofos, e também em determinadas áreas hipotalâmicas. Já a PRL de origem periférica pode agir centralmente via líquido cerebrospinal, através de um sistema de transporte específico mediado por receptores de PRL no plexo coroide (Freeman, 2000). A

expressão de RNAm para receptores de PRL em áreas hipotalâmicas envolvidas na reprodução reforça as evidências da participação deste hormônio no processo reprodutivo (Kokay *et al.*, 2011). Durante a maturação sexual de ratos, o aumento da PRL no plasma incrementa a quantidade de receptores de LH nos testículos, exercendo efeito também no controle e desenvolvimento anatomofuncional das glândulas sexuais acessórias (Bartke, 1977). Por outro lado, o aumento crônico da PRL parece inibir a função reprodutiva em homens e em roedores (Buvat, 2003; Breigeron *et al.*, 2007).

Um aspecto importante que tem sido observado é o impacto negativo que a obesidade exerce sobre a fertilidade masculina. Há crescentes evidências de que a obesidade reduz a qualidade dos espermatozoides, alterando a estrutura física e molecular das células germinativas e também dos espermatozoides maduros, tanto em humanos (MacDonald *et al.*, 2010) como em modelos animais (Teerds *et al.*, 2011), tendo como origem as alterações nos níveis dos hormônios reprodutivos masculinos (Palmer *et al.*, 2012). A obesidade está associada a menores concentrações de globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) (Foresta *et al.*, 2009), e desta forma, uma quantidade maior de testosterona circulante fica disponível para converter-se em estradiol via aromatização no tecido adiposo periférico, levando por fim a um decréscimo na concentração plasmática total de testosterona (Bray, 1997). Além da redução dos níveis de SHBG, este decréscimo da testosterona, na obesidade, está associado a uma redução na amplitude do pico de LH e hiperestrogenemia (Chughtai *et al.*, 2011). Em conjunto, estes fatores têm sido relacionados aos distúrbios de fertilidade frequentemente observados em indivíduos obesos (Pavlovich *et al.*, 2001).

A hiperinsulinemia, ao afetar a função hepática, é o principal determinante da redução do SHBG na medida em que homens obesos estão sob o risco de desenvolvimento de resistência à insulina e hiperinsulinemia (Michalakis *et al.*, 2012), conforme foi demonstrado no estudo de Laaksonem e colaboradores (2003), no qual as concentrações de testosterona total, testosterona livre e SHBG apresentaram uma correlação negativa com as concentrações de insulina, glicose e triglicérides em homens obesos. De forma semelhante, Isidori e colaboradores (1999) demonstraram uma correlação inversa entre os níveis plasmáticos de leptina e de testosterona total e livre. Um estudo posterior de Goulis e colaboradores (2009) demonstrou que elevadas concentrações de leptina produzem um efeito inibitório sobre as células de Leydig, reduzindo a produção de testosterona, mesmo com a administração exógena de SHBG e LH (Isidori *et al.*, 1999).

No entanto, ainda há uma relativa escassez de estudos que relacionem a obesidade a aspectos comportamentais da reprodução masculina. Além disso, pouco se sabe, efetivamente, se a obesidade materna pode ser um dos fatores envolvidos nas alterações reprodutivas da prole do sexo masculino. Deste modo, julgou-se pertinente avaliar os efeitos do consumo materno de dieta de cafeteria sobre os desfechos metabólicos e endócrinos e também sobre os aspectos reprodutivos da prole do sexo masculino.

### 1.6 Angiotensina II e obesidade

A angiotensina II (ang II) é um octapeptídeo presente em diversos sistemas do organismo e que exerce efeitos na regulação do balanço hidroeletrólítico (McKinley *et al.*, 1996) e na homeostase cardiovascular (Saavedra, 1992), sendo um dos mais importantes reguladores da pressão arterial (Beever *et*

*al.*, 2001). Diversos trabalhos têm evidenciado que a ang II é produzida a partir de uma sequência de eventos bioquímicos, representados pelo sistema renina-angiotensina (SRA). Os principais elementos constituintes desse sistema abrangem o angiotensinogênio, a renina, a angiotensina I (ang I), a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a ang II. O processo que compõe a síntese de ang II inicia com a liberação de renina, pelas células justaglomerulares das arteríolas aferentes, dos rins para a circulação. A secreção de renina é estimulada, principalmente, por fatores vinculados a reduções na pressão de perfusão renal, à queda de concentração de cloreto de sódio detectada pelas células da mácula densa, localizadas na porção final do segmento espesso do ramo ascendente da alça de Henle; à estimulação simpática via receptores adrenérgicos. A ação da renina na circulação é clivar o angiotensinogênio, produzido em grande parte no fígado, em ang I, um decapeptídeo inativo. Por sua vez, a ECA, abundante no endotélio vascular pulmonar e sistêmico, converte a ang I em ang II, que produz seus efeitos central e periféricamente no organismo (Reid *et al.*, 1978; Dzau & Re, 1994, Ferrario, 2006). Sabe-se que a ang II exerce seus efeitos através de dois subtipos de receptores, classificados farmacologicamente como receptores para ang II do tipo 1 (AT<sub>1</sub>) e do tipo 2 (AT<sub>2</sub>) (Timmermans *et al.*, 1993; Jöhren *et al.*, 1997). A maioria das ações atribuídas à ang II é mediada pelos receptores AT<sub>1</sub>, os quais estão implicados na mediação dos efeitos já bem estabelecidos da ang II, assim como outros estudos demonstram seu envolvimento na liberação de norepinefrina pelos terminais simpáticos (English & Cassis, 1999), estimulação de processos inflamatórios (Muller *et al.*, 2000) e no crescimento celular (Chung *et al.*, 1996). A existência de vários SRA distribuídos no organismo já está bem consolidada, pois diversos estudos evidenciaram a presença de SRA's localizados no sistema nervoso central (SNC),



além de sistemas locais identificados em tecidos como os rins, coração, adrenais, gônadas, fígado, parede arterial e hipófise (Fitzsimons, 1980; Quinlan & Phillips, 1981; Saavedra, 1992; Griendling *et al.*, 1993; Speth *et al.*, 1999), assim como há ampla distribuição de receptores AT1 nestes tecidos (Allen *et al.*, 2000). Os receptores AT2 também estão distribuídos no organismo, presentes principalmente no sistema nervoso central (SNC) de humanos (McGregor *et al.*, 1995) e em menor expressão nos tecidos de roedores adultos (Song *et al.*, 1991a; Tsutsumi & Saavedra, 1991; Lenkei *et al.*, 1997). Os efeitos atribuídos aos receptores AT2 incluem a vasodilatação e inibição do crescimento celular, indicando ser um receptor contra-regulador da ação dos receptores AT1 (Barker *et al.*, 2006; Ferrario *et al.*, 2006).

A obesidade está relacionada à hipertrofia e hiperplasia do tecido adiposo, que é um órgão endócrino ativo que produz diversos hormônios, incluindo ang II, a qual tem sido investigada em indivíduos com alterações patológicas associadas à obesidade, pois o angiotensinogênio circulante, a renina e a atividade da ECA são aumentados em indivíduos obesos (Licata *et al.*, 1994; Unemura *et al.*, 1997; Goodfreind *et al.*, 1999; Engeli *et al.*, 2005). O tecido adiposo de roedores e humanos contém todos os componentes do SRA (Cassis *et al.*, 1998; Engeli *et al.*, 2000), e receptores do tipo AT1 e AT2 são o tipo prevalente em adipócitos de ratos e camundongos, enquanto os adipócitos de humanos parecem apresentar exclusivamente os receptores do tipo AT1 (Giacchetti *et al.*, 2002). Tem sido demonstrado que a ang II pode contribuir para o desenvolvimento de obesidade através da estimulação do crescimento e diferenciação dos adipócitos (Engeli *et al.*, 2003; Goosens *et al.*, 2003) e para desordens relacionadas à obesidade, incluindo hipertensão, aterosclerose (Carlson *et al.*, 2000; Mundy *et al.*, 2007), resistência à

insulina e DM2 (Goossens *et al.*, 2003; Henriksen 2007; Leung, 2007; Olivares-Reyes *et al.*, 2009). Além disso, o atividade aumentada do SRA no tecido adiposo, com conseqüente aumento de ang II, tem como efeito modificações no fluxo sanguíneo deste tecido através dos seus efeitos vasoconstritores (Bochsman *et al.*, 2001) e estimuladores da neoangiogênese (Goossens *et al.*, 2012).

Adicionalmente, outros trabalhos mostraram que a ang II central (Anderson *et al.*, 2003; Porter & Potratz, 2004) induz redução de peso corporal e da ingestão alimentar em ratos. No entanto, os efeitos da ang II periférica sobre o peso corporal ainda são controversos. A injeção periférica de ang II em ratos jovens (3 semanas) não apresenta efeito (Porter & Potratz, 2004), enquanto que em ratos adultos, a administração de doses reduzidas (175 ng.kg-1.min-1) não altera o peso e de doses mais elevadas (200, 350 e 500 ng.kg-1.min-1) induzem uma redução do peso corporal (Cassis *et al.*, 1998). Na realidade, a ang II não é um peptídeo que é tipicamente associado com a regulação da ingestão alimentar e gasto energético no dia-a-dia (Woods *et al.*, 1998), entretanto, existem condições anormais onde o sistema renina-angiotensina é ativado, como em alterações cardíacas (Pedersen *et al.*, 1986) e obesidade (Rincon-Choles *et al.*, 2002), que requerem redução de peso corporal (Anker *et al.*, 1997; Brink *et al.*, 2002).

### 1.7 Losartan

O fármaco Losartan é um antagonista dos receptores AT1, amplamente usado como anti-hipertensivo (Pals, 1993). Estudos clínicos e de experimentação animal indicam que o tratamento com Losartan impede a ligação da ang II aos receptores AT1, tendo como resposta compensatória a elevação da atividade da renina plasmática e das concentrações de ang II circulante (Christen *et al.*, 1991).

Pals, 1993). Este aumento nas concentrações plasmáticas de ang II reflete a disponibilidade do peptídeo, o qual não se liga aos receptores AT1 para exercer seus efeitos. Quando administrado sistemicamente, o Losartan transpõe a barreira hemato-encefálica e age no SNC (Tedesco *et al.*, 1999), além de sua ação periférica.

Visto que os componentes do SRA apresentam uma correlação positiva com o índice de massa corporal em humanos (Goossens *et al.*, 2003), foi proposto que a redução da atividade do SRA poderia não só tratar a hipertensão relacionada à obesidade, como tratar a obesidade *per se* (Velkoska *et al.*, 2009). Em suporte a esta proposta, foi demonstrado que o uso de inibidores da ECA para o tratamento da hipertensão apresentou efeito de perda de peso em humanos (Hipertension Study Group Investigators, 1984) e em ratos (Setoguchi *et al.*, 2002), e o bloqueio dos receptores AT1 tem demonstrado efeitos de redução da resistência à insulina em ratos (Shiuchi *et al.*, 2004; Aksnes *et al.*, 2006). Deste modo, o presente trabalho propôs investigar o efeito do bloqueio do receptor de ang II do tipo AT1 com o uso do fármaco Losartan sobre diferentes aspectos relacionados à obesidade materna induzida pelo consumo de dieta de cafeteria, assim como possíveis efeitos sobre o desenvolvimento da prole.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos do consumo materno de dieta de cafeteria, administrada em diferentes períodos da reprodução, sobre os desfechos metabólicos, endócrinos e comportamentais das mães e dos seus descendentes do sexo masculino e, ainda, investigar a participação da angiotensina II neste processo.

### 2.2. Objetivos específicos

1) Avaliar os efeitos do consumo da dieta de cafeteria administrada em diferentes períodos da reprodução sobre os desfechos metabólicos, endócrinos e reprodutivos das mães e das suas proles, quando adultos.

2) Avaliar os efeitos do consumo da dieta de cafeteria administrada em diferentes períodos da reprodução, associando-se ao bloqueio farmacológico dos receptores AT1 para angiotensina II, sobre os desfechos metabólicos, endócrinos e reprodutivos das mães e das suas proles, quando adultos.

Sobre as mães e as suas proles foram avaliados os seguintes parâmetros: ganho de peso corporal, peso da gordura abdominal, perfil lipídico, perfil glicêmico, concentrações plasmáticas de insulina, leptina, prolactina e ang II e o comportamento sexual.

Além disso, nas mães foi avaliado o comportamento maternal e nos filhotes machos, quando adultos, foram avaliadas as concentrações plasmáticas de testosterona e FSH.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos descritos a seguir foram realizados conforme as normas estabelecidas no Guia para Cuidado e Uso de Animais de Laboratório do Instituto Nacional de Saúde dos EUA – NIH (1986). O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, sob o número de protocolo 2008221.

#### 3.1 Animais

Ratos machos (n=15) e fêmeas (n= 110) da variedade Wistar com 21 dias de idade e peso corporal de  $40 \pm 10$ g foram obtidos junto à colônia do Biotério Central da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Estes animais foram colocados em caixas-residência (60x50x30cm), agrupados em número de cinco animais por caixa e mantidos no biotério setorial do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) e ciclo claro-escuro de 12/12h com início às 6h00min. Os ratos machos e parte das fêmeas (n=10) foram reservados para posterior utilização na análise do comportamento sexual e fertilização das ratas participantes do experimento (item 6). As demais ratas foram divididas em grupos experimentais conforme descrito no item 3.3.

#### 3.2. Dietas

A dieta de cafeteria foi ofertada às mães, conforme a distribuição dos grupos experimentais. A ração padrão utilizada neste estudo foi a ração para ratos e camundongos Nuvilab CR-1 (Nuvital – Brasil) com densidade energética de 2,95

kcal/g e com peso distribuído em 55% de carboidratos, 22% de proteína e 4,5% de lipídeos.

O modelo de dieta de cafeteria foi reproduzido no presente estudo através da oferta de alimentos industrializados de forma adicional à ração padrão e água. Os alimentos foram reunidos em três grupos alimentares (A, B e C), oferecidos em dias alternados com inclusão de refrigerante em todos os grupos. Para cada grupo alimentar, foram oferecidos somente alimentos frescos e *ad libitum*. Os valores nutricionais de cada alimento foram obtidos a partir do rótulo ou do site do fabricante (Tabela 1).

**Tabela 1:** Conteúdo nutricional da ração padrão e dos alimentos oferecidos na dieta de cafeteria. Dados obtidos dos rótulos ou do site dos fabricantes.

ALIMENTO	GRUPO A					
	Qtd (g)	kcal	Carboidratos (g)	Proteínas (g)	Lipídeos (g)	Na (mg)
Ração padrão (Nutrilab, Brasil)	1	3	0,55	0,22	0,04	2,7
Salame (Magestade, Brasil)	1	3,38	0	0,32	0,24	12,4
Bisnaguinha Seven Boys (Seven Boys, Brasil)	1	3	0,53	0,09	0,04	4,7
Yokitos sabor queijo (Yoki, Brasil)	1	4,8	0,6	0,06	0,24	11
Delliket Jelly Bean (Dori, Brasil)	1	3,8	0,95	0	0	0,2
Cocal-cola (Coca-cola, Brasil)	1	0,4	0,11	0	0	0,05
GRUPO B						
Ração padrão (Nutrilab, Brasil)	1	3	0,55	0,22	0,04	2,7
Linguiça fininha defumada (Perdigão, Brasil)	1	3,2	0,01	0,18	0,32	15,7
Bolo de chocolate (Bauducco, Brasil)	1	3,3	0,5	0,05	0,12	6,18
Biscoito maisena (Isabela, Brasil)	1	4,3	0,73	0,07	0,12	4,33
Marshmallow (Fini, Brasil)	1	3,4	0,8	0,05	0	0,46
Coca-cola (Coca-Cola, Brasil)	1	0,4	0,11	0	0	0,05
GRUPO C						
Ração padrão	1	3	0,55	0,22	0,04	2,7
Presunto com capa de gordura (Sadia, Brasil)	1	1,6	0	0,17	0,09	8,33
Salgadinho Fritello (Pavioli, Brasil)	1	5,1	0,52	0,08	0,29	6,4
Waffer de chocolate (Bauducco, Brasil)	1	5,2	0,63	0,05	0,27	1,13
Bala de goma (Dori, Brasil)	1	3,6	0,9	0	0	0,5
Coca-cola (Coca-cola, Brasil)	1	0,5	0,11	0	0	0,05

À prole (machos), foram ofertadas apenas ração padrão e água *ad libitum* após o desmame. O consumo foi monitorado a cada três dias, subtraindo-se o peso final da ração (g) do peso inicialmente ofertado.

### 3.3 Grupos experimentais

3.3.1. Efeito do consumo de dieta de cafeteria administrada em diferentes períodos da reprodução sobre os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles.

a) Mães que receberam ração padrão e água *ad libitum* desde o seu desmame até o desmame da prole (grupo PAD/PAD).

b) Mães que receberam ração padrão e água *ad libitum* desde o seu desmame, mudando para dieta de cafeteria a partir do 1º dia de gestação até o desmame da prole (grupo PAD/CAF).

c) Mães que receberam dieta de cafeteria desde o seu desmame até o desmame da prole (grupo CAF/CAF).

d) Mães que receberam dieta de cafeteria desde o seu desmame, mudando para ração padrão a partir do 1º dia de gestação (grupo CAF/PAD).

3.3.2.: Efeito da administração de Losartan associado ao consumo de dieta de cafeteria administrada em diferentes períodos da reprodução sobre os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles.

Para esta investigação, foi acrescentado o fármaco Losartan na água de beber de uma parte das mães de cada grupo experimental. Deste modo, foram gerados os seguintes grupos:

- a) Grupo PAD/PAD + LOS;
- b) Grupo PAD/CAF +LOS;
- c) Grupo CAF/CAF + LOS;
- d) Grupo CAF/PAD + LOS.

#### 3.4. Tratamento com Losartan

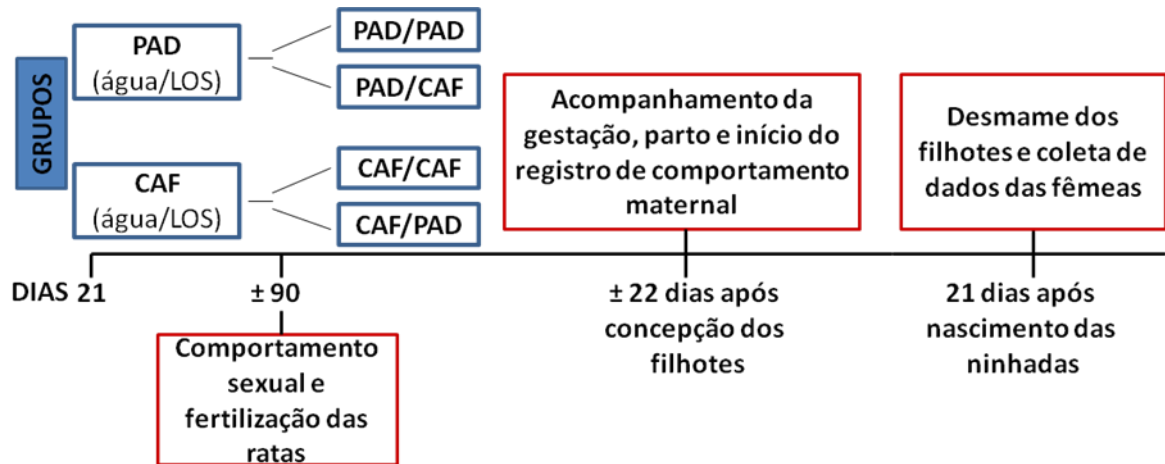
A administração de Losartan foi iniciada ao desmame das ratas (21 dias de vida), concomitantemente à administração da dieta de cafeteria. A dose utilizada foi de 10mg/kg/dia, diluída na água de beber. As ratas foram pesadas a cada 48 horas para ajuste da dose de Losartan. A solução foi trocada a cada 24 horas, no início de cada tarde, de acordo com a curva de ingestão hídrica diária estabelecida. Para isso, o consumo de água foi monitorado diariamente, subtraindo-se a quantidade final de água da quantidade inicialmente ofertada (mL) (dados não mostrados).

#### 3.5. Desenho experimental

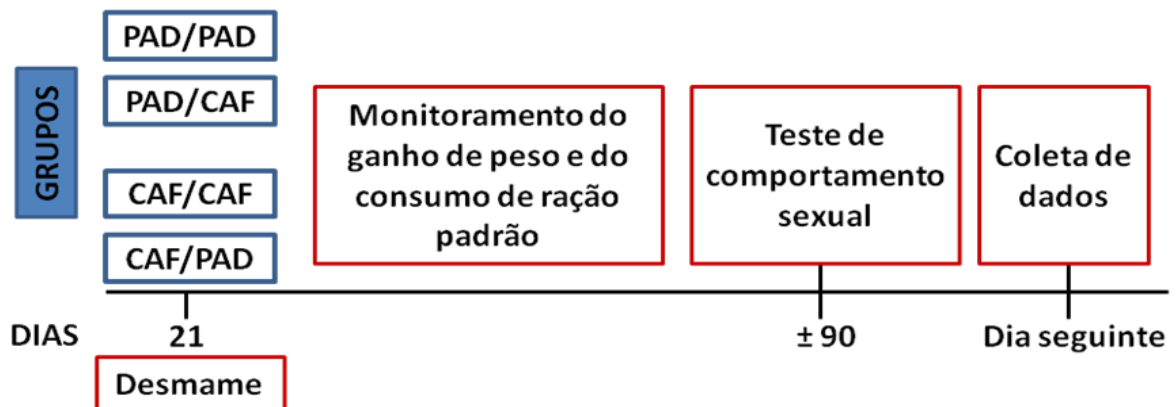
Os grupos experimentais e o desenho experimental são representados de modo resumido no esquema a seguir (Figura 1).



### Mães:



### Prole:



**Figura 1:** Resumo esquemático do desenho experimental.

3.6. Preparação dos ratos machos utilizados para observação do comportamento sexual e para a fertilização das ratas

Para a realização do estudo do comportamento sexual e para a fertilização das ratas utilizadas no experimento, foram utilizados ratos machos sexualmente ativos previamente selecionados, segundo protocolo de Breigeiron e

colaboradores (2002): durante o ciclo escuro (18:00h- 6:00h) os ratos foram expostos a fêmeas ovariectomizadas (OVX) (induzidas à receptividade sexual por meio de reposição hormonal) por 3 noites, alternadamente, para aquisição de experiência sexual. Após este período, os machos permaneceram por 10 dias em abstinência sexual. Foi então realizado o teste de desempenho sexual, consistindo de avaliação, durante 10 minutos, do comportamento sexual diante de fêmeas OVX com reposição hormonal. Foram considerados sexualmente ativos os machos que realizaram pelo menos seis montas durante este período. Esses machos foram então selecionados para testar a receptividade sexual das fêmeas utilizadas no experimento.

Para a etapa da aquisição de experiência sexual seguida do teste de desempenho sexual dos machos, foram utilizadas 10 fêmeas com 60 dias de vida, ovariectomizadas e submetidas a protocolo de reposição hormonal. Para a realização da ovariectomia, as ratas foram anestesiadas com injeção intraperitoneal única contendo uma mistura de 100mg/kg de peso corporal de xilasina (Vetbrands-Brasil) e 50mg/kg de peso corporal de cetamina (Vetbrands- Brasil). Foram realizadas incisões bilaterais na linha axilar média, na altura entre a última costela e crista ilíaca, ficando expostos os ovários e as tubas uterinas. Os ovários foram retirados após a ligadura entre essas duas estruturas. A seguir, as incisões foram suturadas nos planos muscular e cutâneo. Após esse procedimento, as ratas permaneceram de 10 a 14 dias em recuperação e foram submetidas ao protocolo de reposição hormonal para indução da receptividade sexual. A reposição hormonal consistiu-se de duas injeções subcutâneas: a primeira, contendo 20mg de 17 $\beta$ -ciclopentilpropionato de estradiol (Ginestrol® – Köning, Argentina) diluído em 0,2mL de óleo mineral/rata, foi aplicada 48h antes da noite da atividade sexual, e a

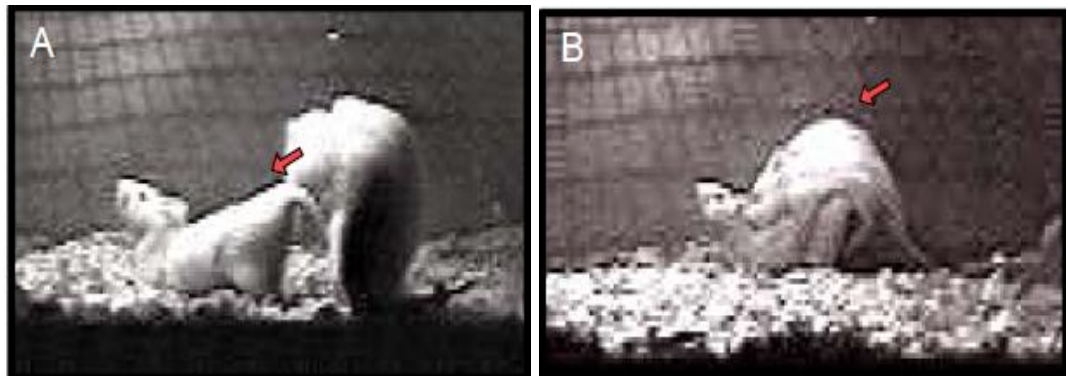
segunda, contendo uma mistura de 20mg de estradiol + 500mg de progesterona (SIGMA – EUA) diluída em 0,2mL de óleo mineral/rata, 6h antes da atividade sexual (Padoin *et al.*, 2001). Todas as fêmeas OVXs induzidas ao estro comportamental por reposição hormonal foram testadas com a presença de um macho, e somente as que apresentaram comportamento de lordose foram utilizadas nos processos de aquisição de experiência e teste de desempenho sexual dos machos (Padoin *et al.*, 2001).

### 3.7. Ciclo estral, comportamento sexual e fertilização das ratas

Fêmeas virgens pertencentes aos diferentes grupos experimentais, a partir do 80º dia de vida, tiveram a citologia vaginal coletada diariamente para observação das características celulares e determinação da fase do ciclo estral. O epitélio vaginal de cada fêmea foi “lavado” com auxílio de um conta-gotas contendo solução salina (NaCl 0,9%) e o material coletado foi analisado a fresco em microscópio óptico, sendo assim definidos: proestro, quando havia predominância de células epiteliais com o núcleo bem definido; estro, quando havia predominância de células epiteliais cornificadas sem núcleo; metaestro, quando havia presença de células cornificadas e leucócitos, e diestro quando havia predominância de leucócitos.

Para avaliação do comportamento sexual das ratas dos diferentes grupos, as ratas que completavam 90 dias de vida e que estavam na fase do proestro foram alocadas em caixa de observação (acrílico 70 x 70 x 35cm) por 10 minutos para ambientação. Um macho previamente selecionado por meio do teste de desempenho sexual foi colocado com a fêmea dando início à sessão de registro, com duração de 15 minutos, realizada no ciclo escuro (entre as 19 e 21h). Para o

registro, foi utilizada uma câmera digital Sony ® Handycam Full HG 64 Gb 12.3MP. Nos vídeos analisados posteriormente, os parâmetros comportamentais avaliados foram a frequência de lordoses (número de vezes que a fêmea eleva a parte traseira do dorso, expondo a genitália) e a frequência de montas (número de vezes que o macho usa as patas dianteiras para segurar a fêmea pelos flancos (Figura 2). O quociente de lordose da receptividade sexual da fêmea foi calculado pela divisão do número de lordoses pelo número de montas (Sodersen & Hansen, 1977).



**Figura 2:** Descrição visual dos comportamentos de lordose da fêmea (A) e monta do macho (B) durante o registro de comportamento sexual.

Após o registro de comportamento sexual, cada fêmea permaneceu durante todo o ciclo escuro em caixa-residência com um macho sexualmente ativo (previamente selecionado). Na manhã seguinte, o macho foi retirado e foi coletado esfregaço vaginal para verificar a presença de sêmen, sendo considerado o 1º dia de gestação quando confirmada a presença de espermatozóides.

A partir do 1º dia de gestação, metade das ratas do grupo controle (PAD) passou a receber dieta de cafeteria (grupo PAD/CAF) e metade das ratas do grupo cafeteria (CAF) passou a receber ração padrão (grupo PAD/CAF), dando origem a 4 diferentes grupos. Todas as ratas tiveram seu peso corporal aferido a

cada 48 horas e o consumo alimentar foi monitorado diariamente. A partir do 21º dia de gestação, as ratas foram alocadas em caixas individuais.

### 3.8. Comportamento Maternal

O dia do nascimento das ninhadas foi considerado dia “0”. No dia pós-natal “1” (DPN1), as ninhadas foram padronizadas em número de 8 filhotes por ninhada, havendo, então, a verificação do peso. O registro de comportamento maternal foi realizado do DPN1 ao DPN10, consistindo-se de três sessões no ciclo claro (10:00h, 13:00h e 16:00h) e uma sessão no ciclo escuro (18:30h), com duração de 72min cada sessão. Em cada sessão, o comportamento maternal das fêmeas foi registrado através de 25 observações pontuais feitas em intervalos de 3 minutos (25 observações por sessão x 4 sessões diárias = 100 observações/mãe/dia). Nestas sessões, as fêmeas lactantes foram observadas em sequência e o(s) comportamento(s) desenvolvido(s) no instante da observação foi (foram) registrado (s) em uma planilha (Tabela 2). Com base na descrição encontrada em estudos prévios (Caldji *et al*, 2000; Champagne *et al*, 2003) os comportamentos observados foram: mãe fora do ninho; amamentação dos filhotes em 3 diferentes posturas: 1) mãe posicionada sobre os filhotes com o dorso muito arqueado (Figura 3a); 2) mãe posicionada sobre os filhotes com o dorso pouco arqueado (Figura 3b); 3) postura passiva, de lado ou em supino, enquanto os filhotes mamam (Figura 3c), lambe os filhotes (Figura 3d), construção do ninho, filhotes fora do ninho, recolhida de filhotes para o ninho e mãe no ninho. Para estes comportamentos, o parâmetro utilizado na análise posterior foi a frequência de cada comportamento. Ao final dos registros, foram somadas as frequências das 3 posturas de amamentação para compor a frequência do comportamento de amamentação. Ao DPN10, a maravalha das caixas

foi trocada, as ninhadas foram novamente pesadas, permanecendo sem intervenções até o desmame, no PDN21.

**Tabela 2:** Planilha de registro do comportamento materno.

<b>RATA:</b> _____	<b>HG</b> - High crouch (amamentando c/ dorso bem arqueado)	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="padding: 2px;"><b>HG</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>LW</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>SUP</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>L</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>CN</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>OFF</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>R</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>FFN</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>HG/L</b></td></tr> <tr><td style="padding: 2px;"><b>MN</b></td></tr> </table>	<b>HG</b>	<b>LW</b>	<b>SUP</b>	<b>L</b>	<b>CN</b>	<b>OFF</b>	<b>R</b>	<b>FFN</b>	<b>HG/L</b>	<b>MN</b>
<b>HG</b>												
<b>LW</b>												
<b>SUP</b>												
<b>L</b>												
<b>CN</b>												
<b>OFF</b>												
<b>R</b>												
<b>FFN</b>												
<b>HG/L</b>												
<b>MN</b>												
	<b>CN</b> - Construção do ninho											
<b>Data do parto:</b> _____	<b>LW</b> - Low crouch (amamentando c/ dorso pouco arqueado)											
	<b>OFF</b> - Mãe fora do ninho/caixa											
<b>Grupo:</b> _____	<b>SUP</b> - Supine post. (amamentando de lado ou de costas)											
	<b>R</b> - Recolhida de filhotes											
<b>DATA:</b> _____	<b>L</b> - Lambendo filhotes											
	<b>FFN</b> - Filhotes fora do ninho											
<b>DIAS PP:</b> _____	<b>HG/L</b> - Amamentando com o dorso bem arqueado e lambendo											
	<b>MN</b> - No ninho sem posição de amamentação											

	CLARO																									
	0	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30	33	36	39	42	45	48	51	54	57	1:00	1:03	1:06	1:09	1:12	
CLARO 1																										
CLARO 2																										
CLARO 3																										
ESCURO 1																										



**Figura 3:** Principais comportamentos maternos analisados: (a) postura de amamentação com o dorso muito arqueado; (b) postura de amamentação com o dorso pouco arqueado; (c) postura de amamentação passiva (supino) e (d) comportamento de lamber os filhotes.

### 3.9. Comportamento sexual da prole (machos)

Os machos (virgens) descendentes dos diferentes grupos experimentais foram submetidos, quando adultos, ao teste de comportamento sexual, realizado no ciclo escuro entre as 19h00min e 22h00min. Eles foram retirados das caixas-residência e colocados em sala anexa ao ratário, em caixas de observação (70x70x35cm) de acrílico para permitir ampla visualização e filmagem do animal, sendo mantidos nestas caixas por 10 minutos para ambientação. Após esse período, uma fêmea OVX com estro comportamental induzido por reposição hormonal foi introduzida na caixa e imediatamente foi dado início ao registro de comportamento, filmado com câmera digital Sony ® Handycam Full HG 64 Gb 12.3 MP durante 20 minutos. Após o registro, cada vídeo foi analisado por observador treinado, através de um programa de exibição de vídeos. A descrição dos comportamentos sexuais do

macho está baseada em dados da literatura (Breigeiron *et al.*, 2002; 2007), e os seguintes parâmetros foram computados:

- Latência de monta: o macho se posiciona atrás da fêmea, coloca suas patas dianteiras sobre a região dorsal da mesma, porém não realiza movimentos pélvicos para penetração vaginal. Quando a monta não era observada durante o registro (frequência igual a zero), foi computado como latência de 1200 segundos, correspondentes ao tempo de vinte minutos.

- Frequência de montas: o número de montas sem realizar intromissão peniana até a realização da primeira monta com intromissão.

- Latência da intromissão: período de tempo contado a partir do início do registro, com a introdução da fêmea na caixa de observação, e a primeira monta com intromissão (penetração vaginal). O macho se posiciona atrás da fêmea, coloca suas patas sobre a região dorsal da mesma, abraçando-a na região do abdome, e realiza sucessivos movimentos pélvicos de aproximação dos flancos para penetração vaginal. Em seguida, o macho afasta-se rapidamente da fêmea apresentando um movimento característico tipo “saída em mola”, precedido de um rápido movimento de abdução das patas dianteiras. Quando a monta com intromissão não era observada durante o registro (frequência igual a zero), foi computado como latência de 1200 segundos, correspondentes ao tempo de vinte minutos.

- Frequência de intromissão- número de intromissões realizadas durante o registro comportamental. Caso o animal não realizasse monta com intromissão neste período, a frequência era considerada nula (zero) e latência máxima (1200 s).



### 3.10. Coleta de sangue e de gordura abdominal

Após o desmame dos filhotes (21 dias após o parto), as fêmeas permaneceram em jejum por 10 a 12 horas (das 22h00min às 9h00min) e, então, foram pesadas e decapitadas. O sangue foi coletado em funis e tubos de ensaio previamente heparinizados, centrifugado a 1500G a 4°C por 15 minutos, e o plasma foi em seguida coletado e estocado a - 70°C para as posteriores dosagens hormonais. As gorduras perigonadal, visceral e retroperitoneal foram retiradas e pesadas conjuntamente em balança digital.

Os filhotes machos, quando adultos, tiveram o sangue e a gordura abdominal coletados da seguinte forma: após o registro de comportamento sexual, cada animal permaneceu em jejum por 10-12h (das 21h00min às 9h00min) e submetidos ao mesmo protocolo descrito para as mães.

### 3.11. Dosagens hormonais

As concentrações plasmáticas de prolactina e FSH foram realizadas por radioimunoensaio de duplo anticorpo, com anticorpos específicos e padrões adquiridos junto ao National Program of Pituitary Hormone, National Institute of Health (Torrance, California, USA). O anticorpo secundário para a precipitação da reação do RIE é produzido em ovelha pelo laboratório do Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). O FSH e a prolactina foram iodinados e purificados. As doses mínimas detectáveis foram: 0,2 ng/ml (FSH); 0.09 ng/ ml (PRL). Os erros intra-ensaio foram 4%, 3% para PRL e FSH, respectivamente.

A concentrações de insulina, leptina e ang II e testosterona foram dosadas através do método ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) com reagentes específicos para rato (Millipore –USA – sensibilidade de detecção

0,2ng/mL; Enzo Life Sciences – USA – sensibilidade de detecção 100pg/mL; Peninsula Laboratores – USA – sensibilidade de detecção 0,02ng/mL; USCN – USA – sensibilidade de detecção 617,3 pg/mL, respectivamente).

Para as concentrações de glicose, colesterol total e triglicérides, foi utilizado o método colorimétrico utilizando-se kits comerciais da Labtest (Labtest, Brasil), com sensibilidade de detecção mínima de 0,32mg/dL (glicose), 1,04 md/dL (colesterol total) e 3,0mg/dL (triglicérides).

### 3.12. Análise estatística

Todos os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk.

Para os dados paramétricos, foi utilizado o Teste *t* de Student quando uma variável foi comparada entre 2 grupos. Para os dados não paramétricos foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Quando foi comparada uma variável entre mais de dois grupos foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de 1 via seguida pelo pós-teste de Student Newman-Keuls. Para as análises nas quais foram comparadas duas variáveis entre os grupos foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) de 2 vias, seguida de pós-teste de Bonferroni. Para a avaliação dos efeitos da dieta e do tratamento sobre determinada variável nos grupos e entre os grupos, assim como a interação entre o tempo e o tratamento sobre a variável estudada, utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA) de 2 vias para medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM.

Para os dados não-paramétricos com mais de dois grupos (comportamento sexual dos machos), foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis. Os

resultados são expressos como mediana e intervalo interquartil (25% e 75% do período).

Para os dados de correlação entre duas variáveis, foi utilizado o teste de Pearson (dados paramétricos) ou de Spearman (dados não-paramétricos). A correlação foi considerada perfeita quando  $r^2 = 1$ ; forte quando  $r^2 > 0.7$ ; moderada quando  $r^2 = 0.3 - 0.7$  e fraca quando  $r^2 < 0.3$ . A correlação é considerada inexistente quando  $r^2 = 0$ . As variáveis correlacionam-se inversamente quando  $r^2 = -1$ .

Todos os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism 5 e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $P < 0,05$ .

### 3.13. Descarte de resíduos

Os resíduos biológicos (material contaminado com sangue e carcaças de animais) foram descartados em sacos de lixo brancos, devidamente identificados e encaminhados para o descarte conforme as normas vigentes no Departamento de Fisiologia (UFRGS) e no Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL- UFRGS). Os resíduos químicos foram acondicionados em recipientes de 5L com etiquetas contendo a identificação e classificação do composto químico, sendo posteriormente encaminhados para tratamento pelo Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos (CGTRQ -UFRGS).

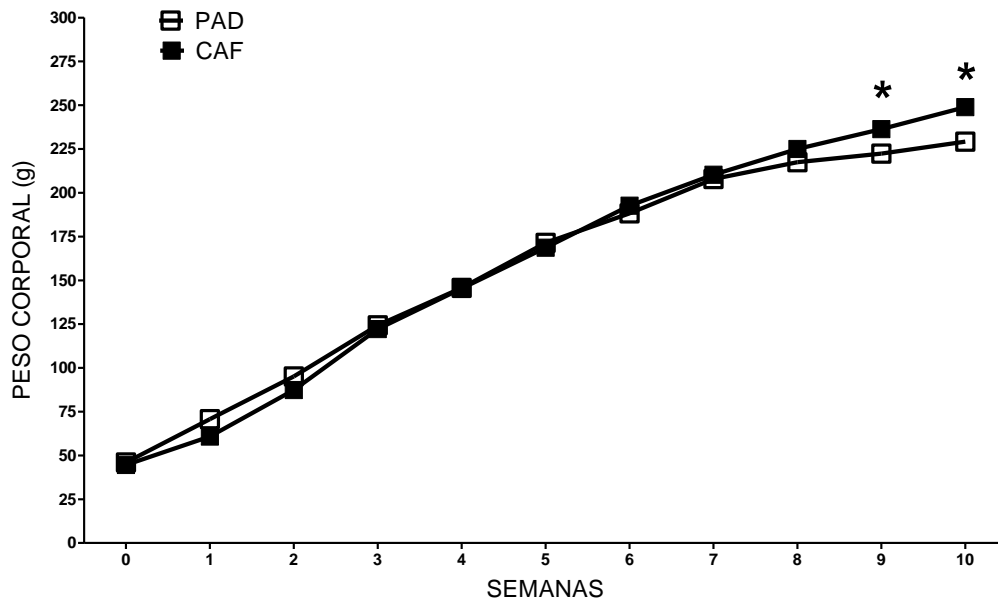
## 4. RESULTADOS

### **4.1. Efeito do consumo de dieta de cafeteria administrada em diferentes períodos sobre o desenvolvimento corporal e os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles.**

O experimento foi iniciado com dois grupos de fêmeas, Padrão (PAD, controle) e Cafeteria (CAF), com 21 dias de vida. Durante 10 semanas os animais receberam suas respectivas dietas e tiveram seu peso corporal aferido semanalmente.

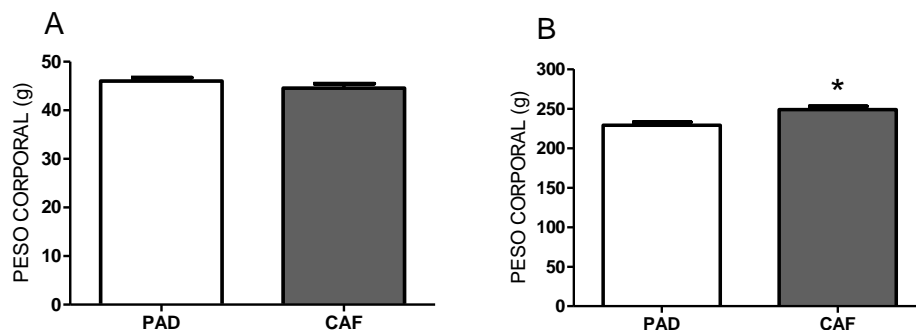
#### **4.1.1. Período pré-gestacional: Ganho de peso corporal desde o desmame até a idade adulta.**

A figura 4 mostra a evolução do ganho de peso corporal, analisado através de ANOVA de duas vias para medidas repetidas. O peso corporal sofreu interação significativa dos fatores tempo e dieta [ $F(10, 480) = 9,41$ ;  $P < 0,05$ ], somente do tempo [ $F(10,480) = 2220$ ;  $P < 0,05$ ] mas não sofreu influência significativa somente da dieta [ $F(1,480) = 0,56$ ;  $P > 0,05$ ]. A partir da nona semana, o grupo CAF passou a apresentar um peso corporal significativamente maior em relação ao grupo PAD ( $P < 0,05$ ).



**Figura 4:** Efeito da dieta de cafeteria pré-gestacional sobre a evolução do peso corporal ao longo de 10 semanas de experimento das ratas dos grupos PAD (n=25) e CAF (n=25). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de duas vias para medidas repetidas com pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \*P<0,05 em relação ao controle.

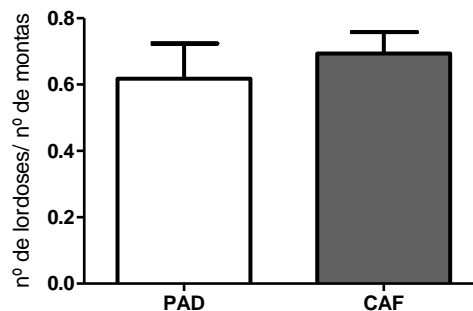
A figura 5 representa a diferença de peso corporal entre os grupos PAD e CAF. Através do teste *t* de Student não foi verificada diferença de peso corporal entre os grupos no início do experimento ( $P > 0,05$ ; Fig. 5A). Ao final de 10 semanas de administração de dieta de cafeteria o grupo CAF apresentou aumento de peso corporal em relação ao grupo PAD ( $P < 0,05$ ; Fig. 5B).



**Figura 5:** Peso corporal aos 21 dias de vida (A) e aos 90 dias de vida (B) das ratas dos grupos PAD (n= 25) e CAF (n=25). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Teste *t* Student. \* P<0,05.

#### 4.1.2. Comportamento sexual

Ao final de 10 semanas de consumo de dieta de cafeteria, na noite do proestro, as ratas dos grupos PAD e CAF foram submetidas ao teste de comportamento sexual. Através do teste *t* de Student não foi observada diferença significativa na receptividade sexual, avaliada através do quociente de lordose ( $P > 0,05$ ), representado na figura 6.

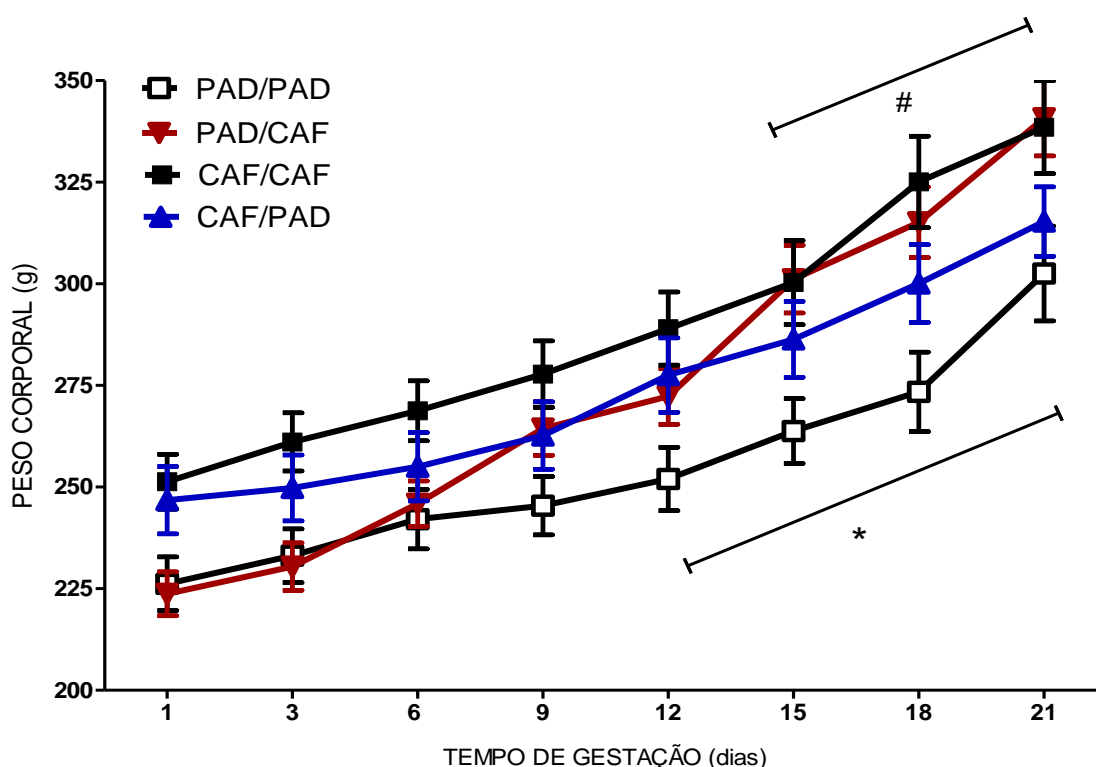


**Figura 6:** Efeito da dieta de cafeteria administrada a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses/ número de montas) das ratas dos grupos PAD (n=24) e CAF (n=23). Valores expressos como média ± E.P.M. Teste *t* de Student.

Após a realização do teste de comportamento sexual, tendo apresentado receptividade sexual, cada fêmea permaneceu por 12 horas com um macho sexualmente ativo, com o objetivo de induzir a prenhez. Na manhã seguinte, foram consideradas potencialmente prenhas as ratas em cujo esfregaço vaginal havia espermatozóides. Considerado este como sendo o primeiro dia de uma potencial gestação, os grupos PAD e CAF foram subdivididos em outros dois grupos: metade das fêmeas do grupo PAD passou a receber dieta de cafeteria, sendo produzido o grupo PAD/CAF e metade do grupo CAF passou a receber ração padrão, sendo produzido o grupo CAF/PAD. Foram gerados, portanto, quatro diferentes grupos, que tiveram seu peso corporal monitorado a cada três dias.

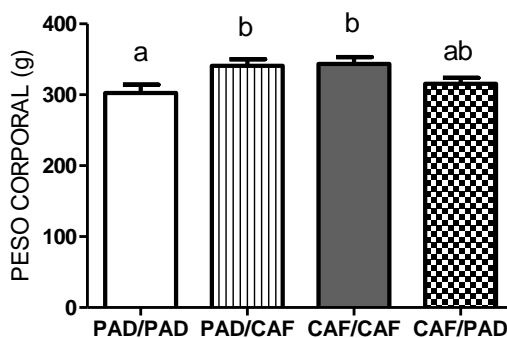
### 4.1.3. Ganho de peso corporal durante a gestação

A figura 7 representa a evolução do peso corporal dos quatro grupos a partir do 1º até o 21º dia gestacional. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostra que houve interação dos fatores dieta x tempo de gestação [ $F(21,245)=13,52$ ;  $P<0,05$ ], assim como houve influência somente do tempo [ $F(7,245)=576,42$ ;  $P<0,05$ ] e da dieta [ $F(3,245)=2,896$ ;  $P<0,05$ ]. A partir do 12º dia de gestação, o grupo CAF/CAF apresentou aumento no ganho de peso corporal quando comparado ao grupo PAD/PAD e este aumento sustentou-se até o final da gestação ( $P<0,05$ ). A partir da 15º dia de gestação, o grupo PAD/CAF apresentou aumento de peso corporal quando comparado ao grupo PAD/PAD e este aumento sustentou-se até o final da gestação ( $P<0,05$ ).



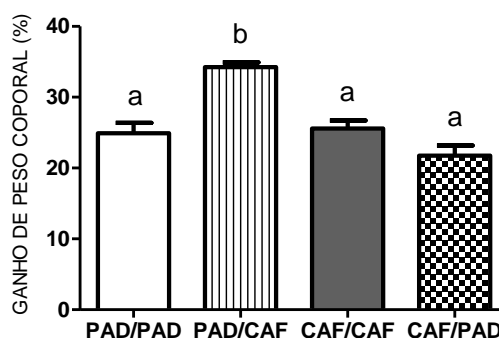
**Figura 7:** Efeito da dieta de cafeteria a partir do 1º dia de gestação sobre a evolução do peso corporal de ratas dos grupos PAD/PAD (n=12), PAD/CAF (n=12), CAF/CAF (n=12) e CAF/PAD (n=11). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias para medidas repetidas com de pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. \* Grupo PAD/PAD versus CAF/CAF; # Grupo PAD/PAD versus PAD/CAF. ( $P<0,05$ ).

A figura 8 representa o peso corporal dos grupos no final da gestação. Os grupos CAF/CAF e PAD/CAF apresentaram um peso corporal superior ao grupo PAD/PAD [F(3,46)= 6,19; P<0,05].



**Figura 8:** Peso corporal no final da gestação das ratas dos grupos PAD/PAD (n=12), PAD/CAF (n=12), CAF/CAF (n=12) e CAF/PAD (n=11). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newuman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (P<0,05).

A figura 9 representa o ganho percentual de peso corporal durante a gestação nas ratas dos quatro diferentes grupos. A ANOVA de uma via mostra que o consumo de dieta de cafeteria a partir do 1º dia de gestação (grupo PAD/CAF) produziu um maior e significativo percentual de ganho de peso corporal comparando-se aos demais grupos [F(3,38)= 23,74; P<0,05].

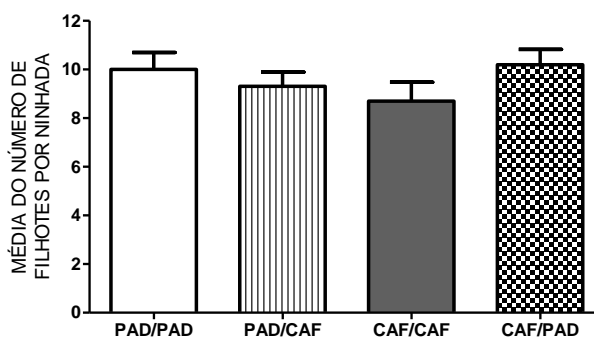


**Figura 9:** Efeito da dieta de cafeteria sobre o percentual de ganho de peso corporal durante a gestação das ratas dos grupos PAD/PAD (n=12), PAD/CAF (n=12), CAF/CAF (n=12) e CAF/PAD (n=11). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newmann-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (P<0,05).



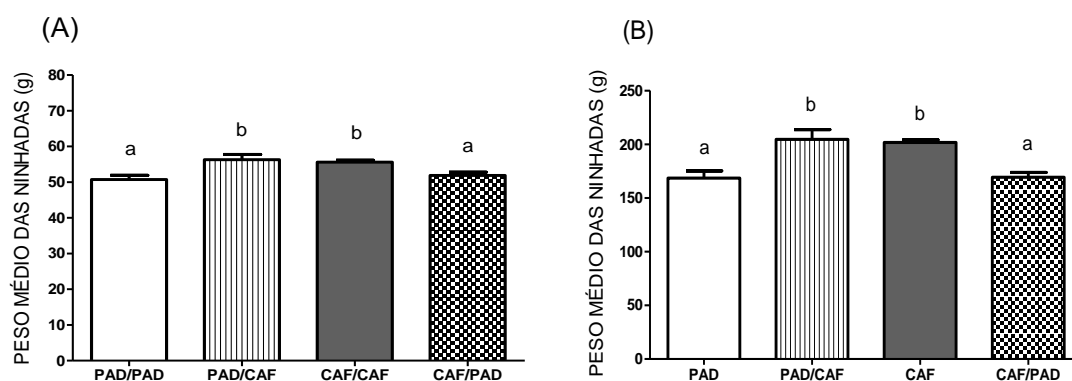
#### 4.1.4. Número de filhotes e peso das ninhadas

A figura 10 representa a média do número de filhotes por ninhada, indicando que não houve diferença significativa entre os grupos ( $P > 0,05$ ).



**Figura 10:** Média no número de filhotes por ninhada, nascidos das ratas dos grupos PAD/PAD (n=11), PAD/CAF (n=12), CAF/CAF (n=12) e CAF/PAD (n=11). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via.

Após a padronização das ninhadas em número de 8 filhotes, foi verificado o peso corporal das ninhadas no 1º (A) e no 10º dia pós-natal (B). Representada na figura 11, a ANOVA de uma via mostra que no 1º dia pós-natal, o peso das ninhadas dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF foi significativamente superior aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD [ $F(3,40) = 6,09$ ;  $P < 0,05$ ]. No 10º dia pós-natal, essa diferença tornou-se mais acentuada [ $F(3,40) = 9,62$ ;  $P < 0,05$ ].

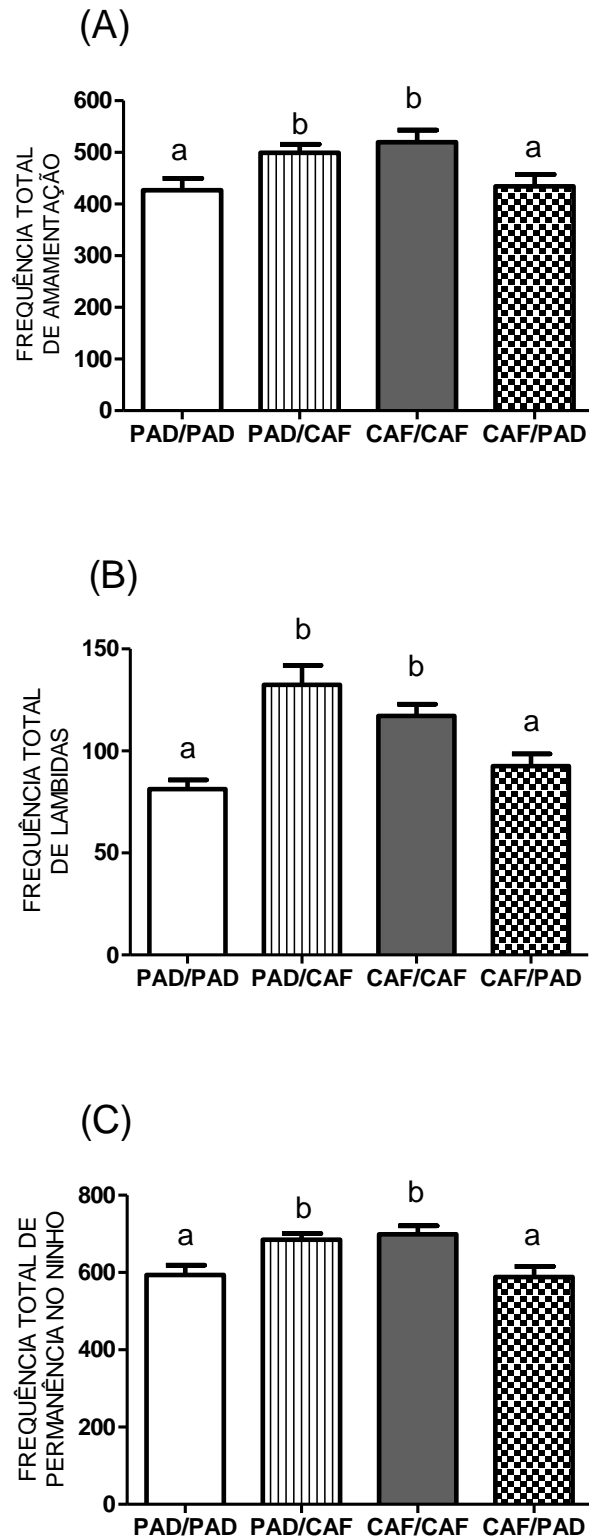


**Figura 11:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a média do peso das ninhadas no 1º (A) e no 10º dia pós-natal (B) nascidas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=11), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.5. Comportamento maternal

O comportamento maternal foi registrado durante os 10 primeiros dias após o nascimento das ninhadas.

A figura 12 representa a frequência total de amamentação (A), a frequência total do comportamento de lambidas (B) e a frequência total de permanência no ninho (C). A ANOVA de uma via indica que ao final de 10 dias de registro, os grupos CAF/CAF e PAD/CAF apresentaram aumento no número total das frequências de amamentação [ $F(3,40) = 4,7$ ;  $P < 0,05$ ] (Fig.12A), aumento no número total das frequências de lambida [ $F(3,40) = 10,47$ ;  $P < 0,05$ ] (Fig 12B) e aumento no número total das frequências e permanência no ninho PAD [ $F(3,40) = 6,69$ ;  $P < 0,05$ ] (Fig 12C) quando comparados aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD.

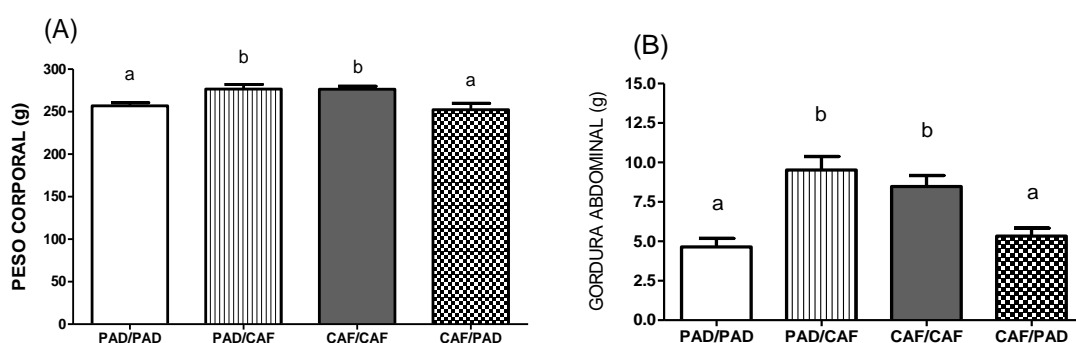


**Figura 12:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a frequência total dos comportamentos de amamentação (A), de lambida (B) e de permanência no ninho (C) durante 10 dias das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=11), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.6. Peso corporal e gordura abdominal após o desmame dos filhotes

Vinte um dias após o nascimento das ninhadas, os filhotes foram desmamados e as mães foram pesadas e sacrificadas para coleta e pesagem de gordura abdominal e coleta de sangue para as dosagens hormonais, perfil lipídico e perfil glicêmico (8-10 horas de jejum).

A figura 13 representa o peso corporal (A) e o peso da gordura abdominal (B) dos diferentes grupos 21 dias após o nascimento das ninhadas. Através da ANOVA de uma via, os grupos CAF/CAF e PAD/CAF apresentaram aumento significativo de peso corporal comparando-se aos demais grupos [ $F(3,41)= 5,77$ ;  $P<0,05$ ]. Os mesmos grupos exibiram aumento significativo do conteúdo de gordura abdominal quando comparados aos demais grupos [ $F(3,41)= 12,06$ ;  $P<0,05$ ].

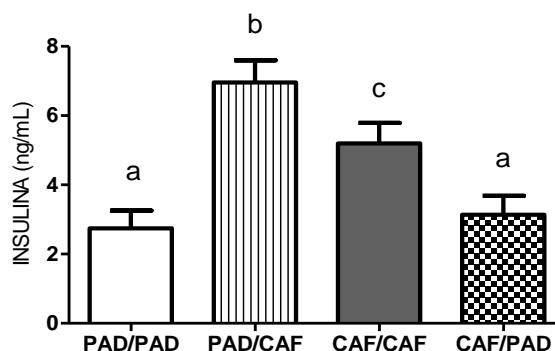


**Figura 13:** Efeito dieta de cafeteria sobre o peso corporal (A) e sobre a gordura abdominal (B) das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=11), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).

#### 4.1.7. Insulina

A figura 14 representa as concentrações plasmáticas de insulina das ratas dos diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de uma via mostrou aumento significativo na concentração plasmática de insulina no grupo

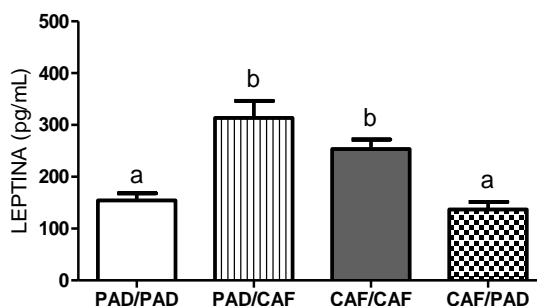
PAD/CAF quando comparado aos demais grupos e do grupo CAF/CAF quando comparado aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD [ $F(3,33)= 11,71$ ;  $P<0,05$ ].



**Figura 14:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de insulina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD ( $n= 8$ ), PAD/CAF ( $n= 9$ ), CAF/CAF ( $n=7$ ) e CAF/PAD ( $n= 10$ ). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).

#### 4.1.8. Leptina

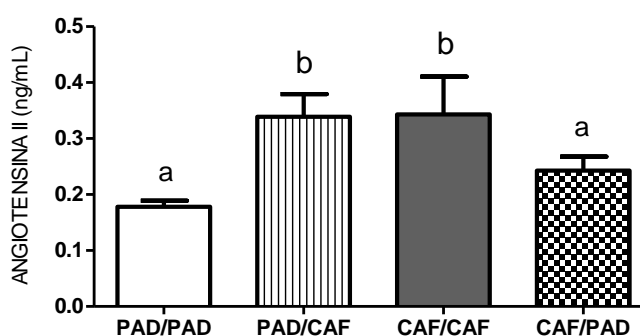
A figura 15 representa as concentrações plasmáticas de leptina das ratas dos diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de uma via mostrou aumento significativo na concentração plasmática de leptina nos grupos CAF/CAF e PAD/CAF quando comparados aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD [ $F(3,33)= 12,50$ ;  $P<0,05$ ].



**Figura 15:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de leptina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD ( $n= 8$ ), PAD/CAF ( $n= 6$ ), CAF/CAF ( $n=7$ ) e CAF/PAD ( $n= 10$ ). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).

#### 4.1.9. Angiotensina II

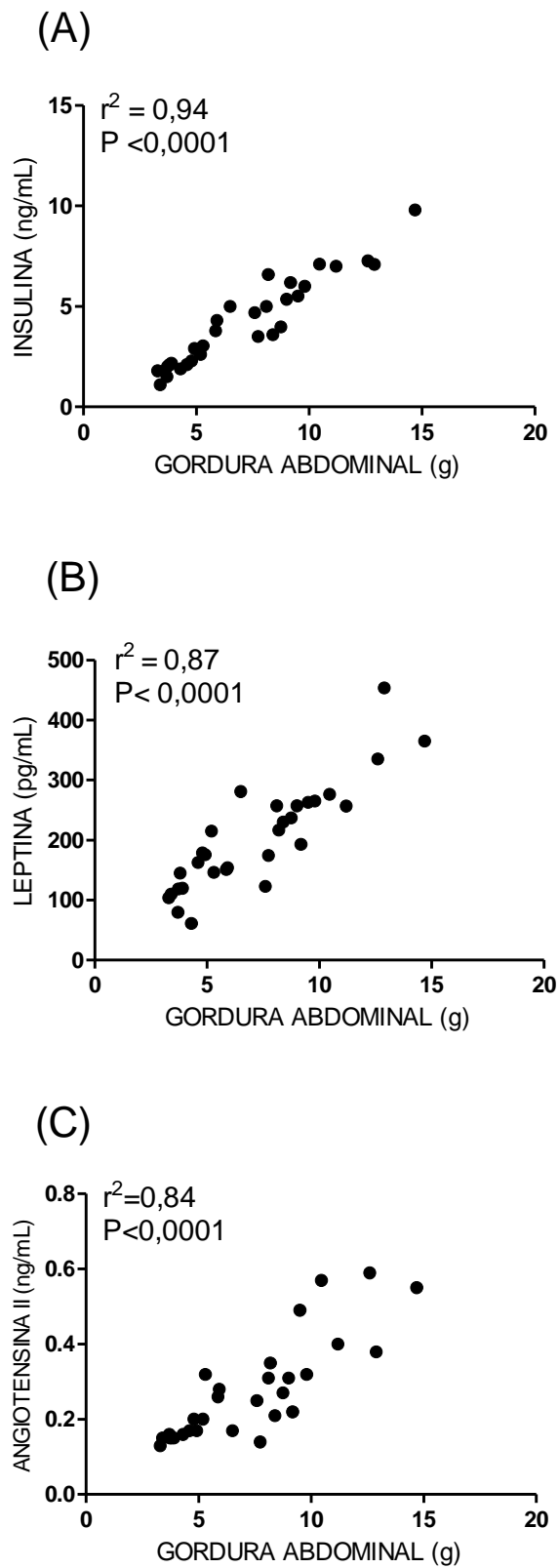
A figura 16 representa as concentrações plasmáticas de ang II das ratas dos diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de uma via mostrou aumento significativo nas concentrações plasmáticas de ang II nos grupos CAF/CAF e PAD/CAF quando comparados aos demais grupos [F(3,38)= 5,77; P<0,05].



**Figura 16:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de ang II 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n= 9), PAD/CAF (n= 10), CAF/CAF (n=8) e CAF/PAD (n= 9). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos (P<0,05).

#### 4.1.10. Correlação entre gordura abdominal versus insulina, leptina e angiotensina II

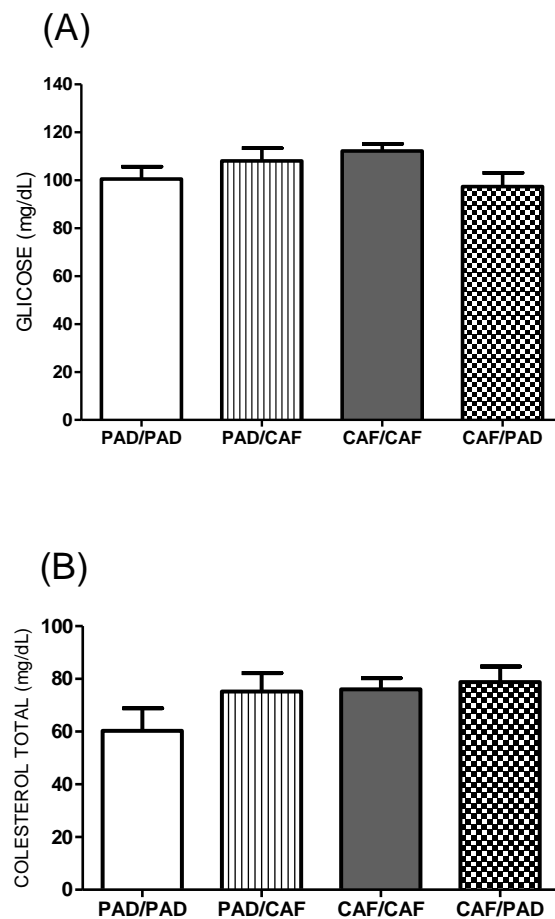
A figura 17 representa as correlações existentes entre o conteúdo de gordura abdominal e as concentrações plasmáticas de insulina, leptina e angiotensina II nas ratas dos diferentes grupos. A correlação entre gordura abdominal e insulina (A) foi considerada fortemente positiva ( $r^2= 0,94$ ; P<0,05); entre gordura abdominal e leptina (B) foi considerada fortemente positiva ( $r^2 = 0,87$ ; p<0,05) e a correlação entre gordura abdominal e ang II (C) foi considerada fortemente positiva ( $r^2= 0,85$ ; P<0,05).



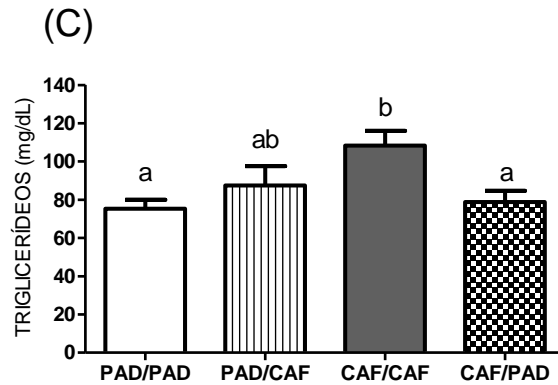
**Figura 17:** Correlação entre gordura abdominal e concentração plasmática de insulina (A), de leptina (B) e de ang II (C) das ratas dos grupos PAD/PAD (n= 8), PAD/CAF (n= 6), CAF/CAF (n=7) e CAF/PAD (n= 9).

#### 4.1.11. Glicose, colesterol total e triglicerídeos.

A figura 18 representa as concentrações plasmáticas de glicose (A), colesterol total (B) e de triglicerídeos (C) de jejum das ratas dos diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de uma via demonstrou que não houve diferenças significativas nas concentrações de glicose e de colesterol total entre os grupos ( $P>0,05$ ). O mesmo teste mostrou que a concentração plasmática de triglicerídeos apresentou-se elevada no grupo CAF/CAF quando comparado aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD [ $F(3,35)= 3,88$ ;  $P<0,05$ ].



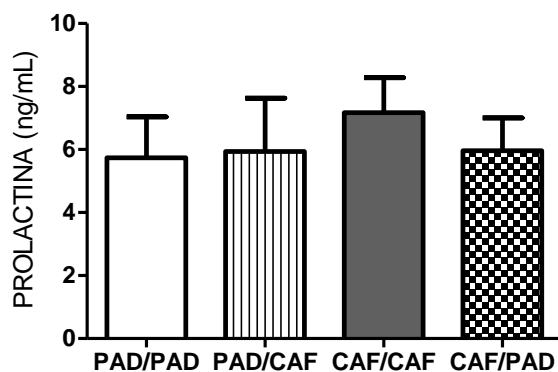




**Figura 18:** A- Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de glicose 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n= 9), PAD/CAF (n= 11), CAF/CAF (n=9) e CAF/PAD (n= 10). B - Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de colesterol total 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n= 8), PAD/CAF (n= 9), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n= 10) e C - Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de triglicerídeos 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n= 8), PAD/CAF (n= 9), CAF/CAF (n=9) e CAF/PAD (n= 10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.12. Prolactina

A figura 19 representa as concentrações plasmáticas de prolactina das ratas dos diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de uma via não mostrou diferenças significativas entre os grupos. [ $F(3,35) = 0,2$ ;  $P > 0,05$ ].

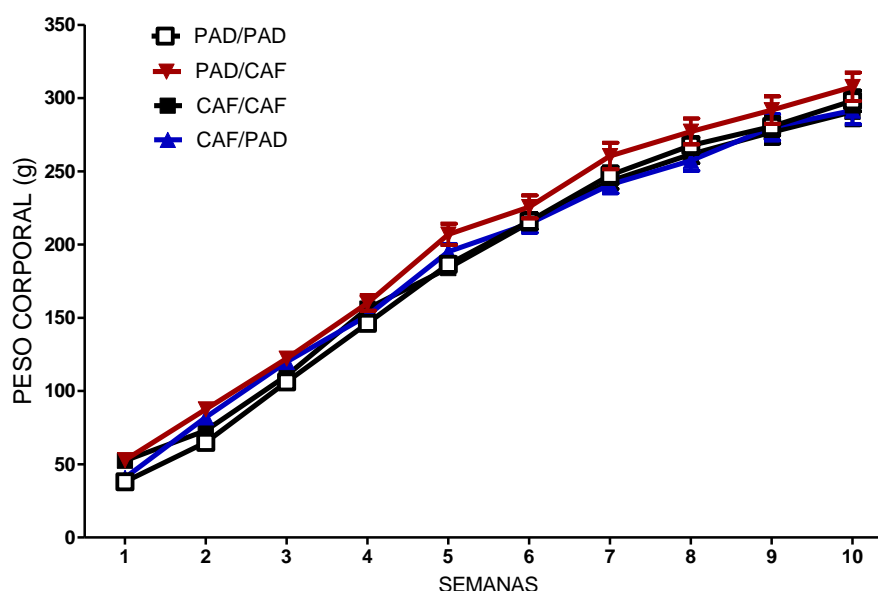


**Figura 19:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de prolactina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n= 9), PAD/CAF (n= 8), CAF/CAF (n=8) e CAF/PAD (n= 8). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls.

A análise dos dados das proles foi iniciada com o desmame dos filhotes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD. Estes animais foram alimentados somente com ração padrão (consumo monitorado a cada 3 dias) e tiveram seu peso corporal aferido semanalmente.

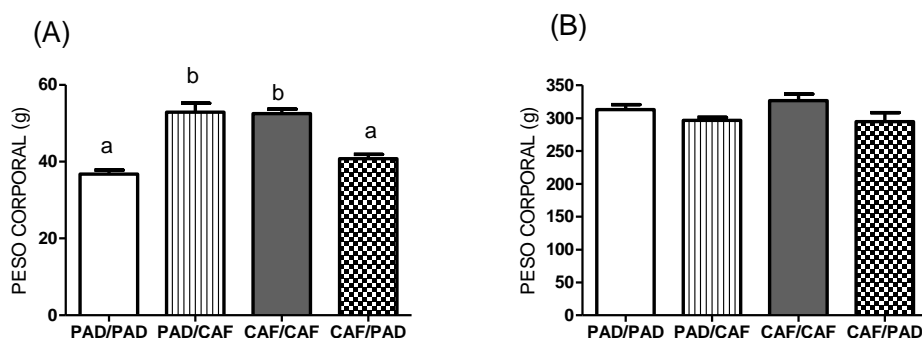
#### 4.1.13. Ganho de peso corporal dos filhotes a partir do desmame até a idade adulta.

A figura 20 representa a evolução do peso corporal ao longo de 10 semanas. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas demonstrou que houve interação entre os fatores dieta materna x tempo [ $F(27,333)= 1,86$ ;  $P<0,05$ ], houve influência somente do tempo [ $F(9,333)= 2403$ ;  $P<0,05$ ], porém não houve influência somente da dieta materna [ $F(3, 333)= 1,89$ ;  $P>0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni não apontou diferenças significativas entre os grupos em nenhum período do desenvolvimento ( $P>0,05$ ).



**Figura 20:** Efeito da dieta materna sobre o ganho de peso corporal dos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias utilizando-se dia como medida repetida, com pós-teste de Bonferroni. \*  $P < 0,05$ .

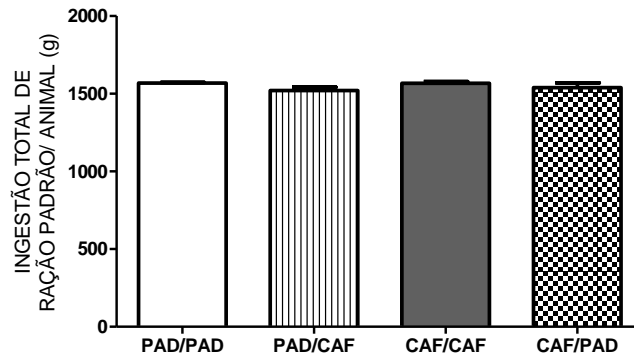
A figura 21 representa o peso corporal da prole (machos) dos diferentes grupos ao desmame (A) e aos 90 dias de vida (B). A ANOVA de uma via mostra que os grupos CAF/CAF e PAD/CAF apresentaram aumento no peso corporal ao desmame comparando-se aos demais grupos [ $F(3,39)= 28,6; P<0,05$ ]. Aos 90 dias de vida, não foram observadas diferenças entre os grupos ( $P>0,05$ ).



**Figura 21:** Efeito da dieta materna sobre peso corporal ao desmame (A) e aos 90 dias (B) dos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).

#### 4.1. 14. Consumo de ração padrão total desde o desmame até a idade adulta.

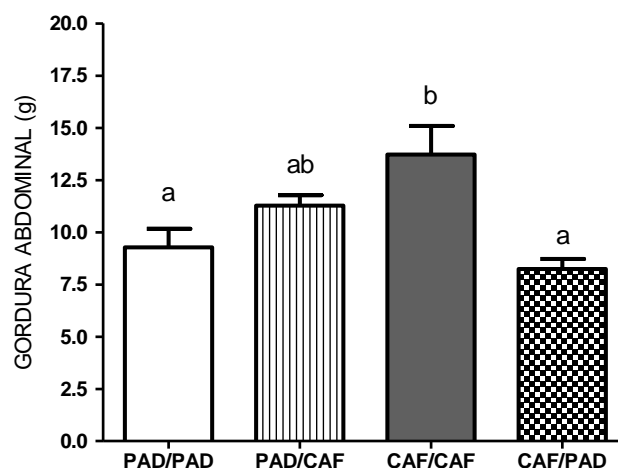
A figura 22 representa o consumo total de ração padrão dos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD. A ANOVA de uma via não apontou diferenças significativas no consumo total de ração padrão, desde o desmame até os 90 dias de vida ( $P>0,05$ ).



**Figura 22:** Efeito da dieta materna sobre o consumo de ração padrão total por animal, desde o desmame até os 90 dias de vida, dos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M.

#### 4.1.15. Gordura Abdominal

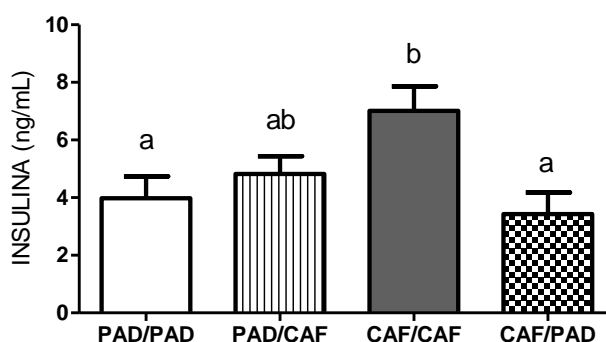
A figura 23 representa o peso do conteúdo de gordura abdominal em descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstrou um aumento significativo no conteúdo de gordura abdominal nos animais do grupo CAF/CAF [ $F(3,39)= 7,44$ ;  $P<0,05$ ] quando comparados aos demais grupos.



**Figura 23:** Efeito da dieta materna sobre o conteúdo de gordura abdominal nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).

#### 4.1.16. Insulina

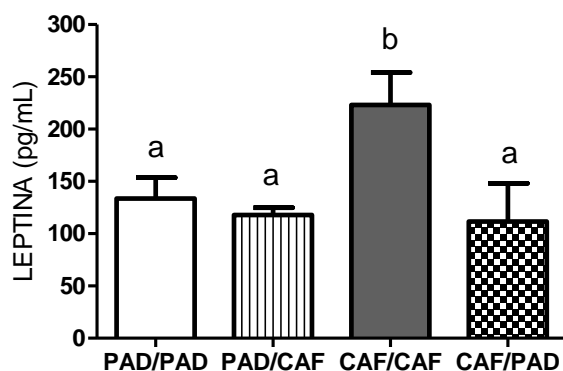
A figura 24 representa a concentração plasmática de insulina de jejum em machos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstra que os animais do grupo CAF/CAF apresentaram aumento na concentração de insulina quando comparados aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD [ $F(3,38)= 4,44$  ; $P<0,05$ ].



**Figura 24:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de insulina nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=9), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).

#### 4.1.17. Leptina

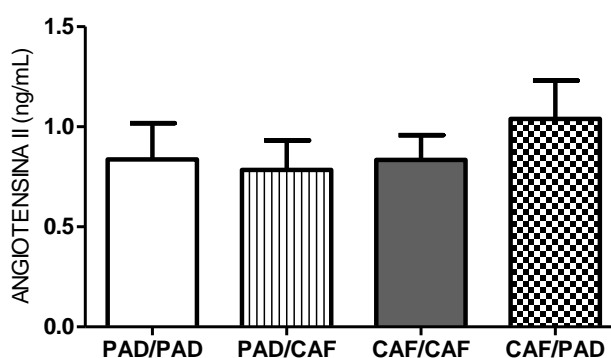
A figura 25 representa a concentração plasmática da leptina de jejum em machos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstra que os animais do grupo CAF/CAF apresentaram aumento significativo na concentração de leptina quando comparados aos demais grupos [ $F(3,32)= 3,9$ ;  $P<0,05$ ].



**Figura 25:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de leptina nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=6), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=7). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.18. Angiotensina II

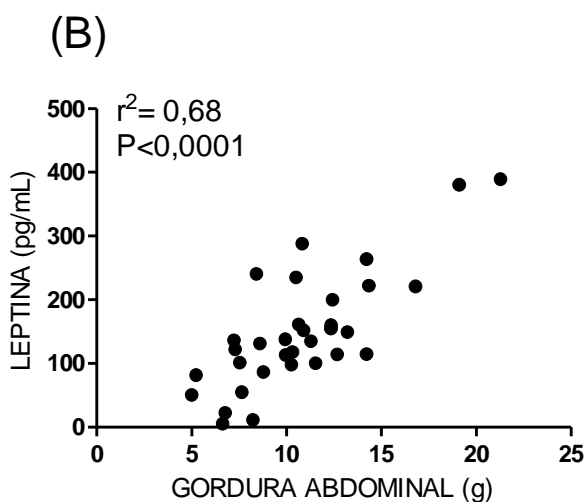
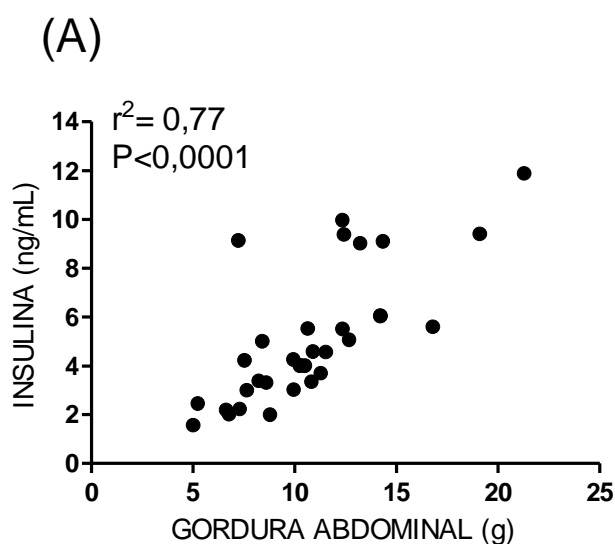
A figura 26 representa a concentração plasmática de angiotensina II em machos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstra que não houve diferenças significativas entre os grupos [ $F(3,38) = 0,47$ ;  $P > 0,05$ ].

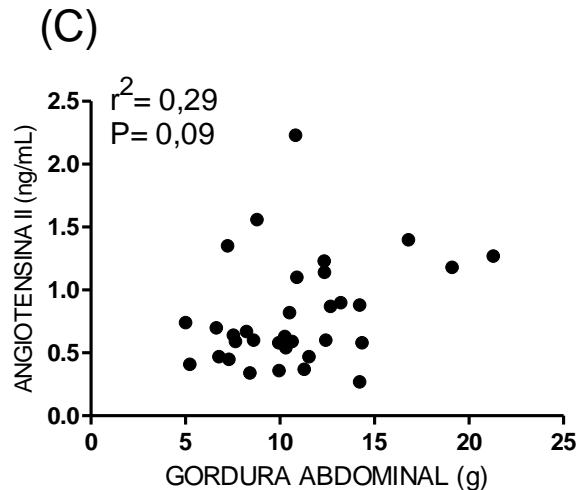


**Figura 26:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de angiotensina II nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=9), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls.

#### 4.1. 19. Correlação entre gordura abdominal *versus* insulina, leptina e angiotensina II

A figura 27 representa as correlações existentes entre o conteúdo de gordura abdominal e as concentrações plasmáticas de insulina, de leptina e de angiotensina II na prole das ratas dos diferentes grupos. A correlação entre gordura abdominal e insulina (A) foi considerada fortemente positiva ( $r^2 = 0,77$ ;  $P < 0,05$ ); entre gordura abdominal e leptina (B) foi considerada moderadamente positiva ( $r^2 = 0,68$ ;  $p < 0,05$ ) e a correlação entre gordura abdominal e ang II foi considerada positiva, porém, não estatisticamente significativa ( $r^2 = 0,29$ ;  $P > 0,05$ ).



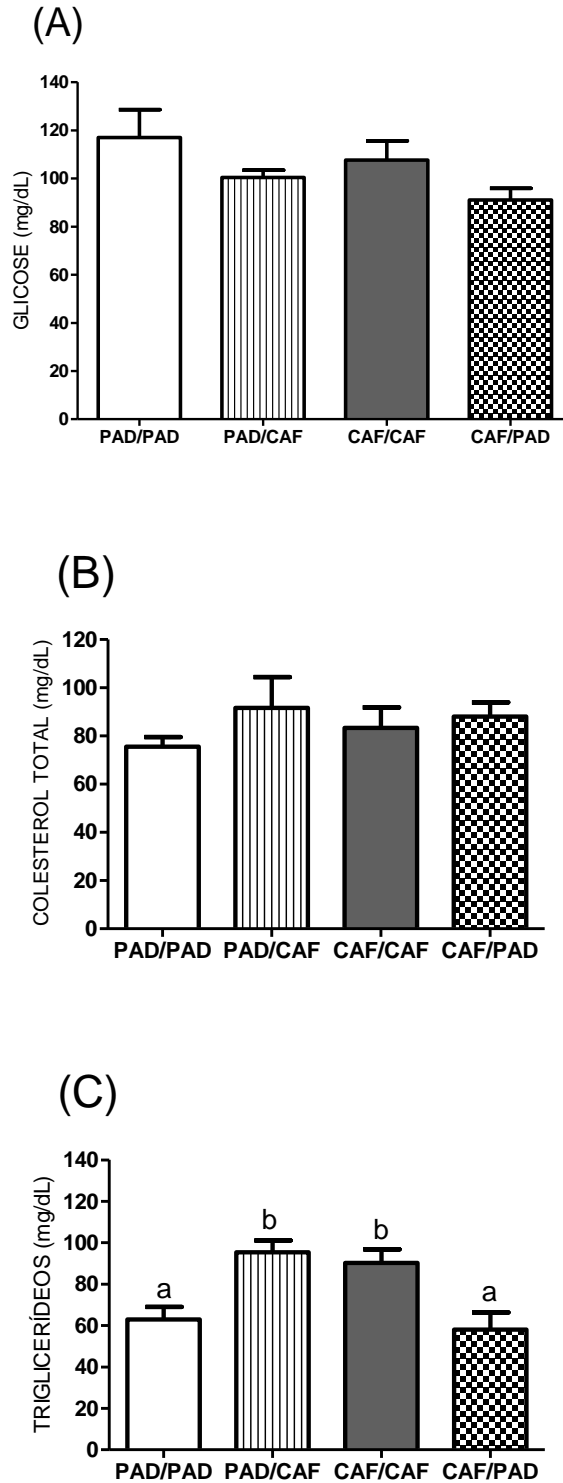


**Figura 27:** Correlação entre gordura abdominal e concentração plasmática de insulina (A), de leptina (B) e de ang II (C) entre os descendentes dos grupos PAD/PAD (n= 10), PAD/CAF (n= 7), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n= 8).

#### 4.1.20. Glicose, colesterol total e triglicerídeos.

A figura 28 representa a concentração plasmática de glicose (A), colesterol total (B) e triglicerídeos (C) de jejum em machos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstra que não houve diferenças significativas nas concentrações de glicose e colesterol total entre os grupos ( $P > 0,05$ ). O mesmo teste indica que os grupos PAD/CAF e CAF/CAF apresentaram elevação no conteúdo plasmático de triglicerídeos quando comparados aos demais grupos [ $F(3,38) = 7,05$ ;  $P < 0,05$ ].

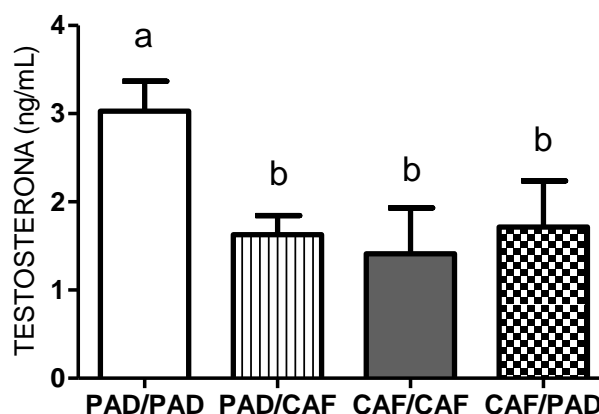




**Figura 28:** A- Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de glicose de jejum nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10); B- Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de colesterol total de jejum nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10); C- Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de triglicérides de jejum nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=11), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.21. Testosterona

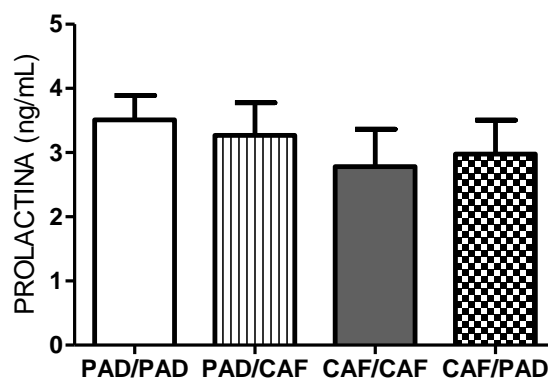
A figura 29 representa a concentração plasmática de testosterona em machos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstra que os grupos PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD tiveram redução significativa de testosterona quando comparados ao grupo PAD/PAD [ $F(3,36)= 3,45$ ;  $P<0,05$ ].



**Figura 29:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de testosterona nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=8). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).

#### 4.1.22. Prolactina

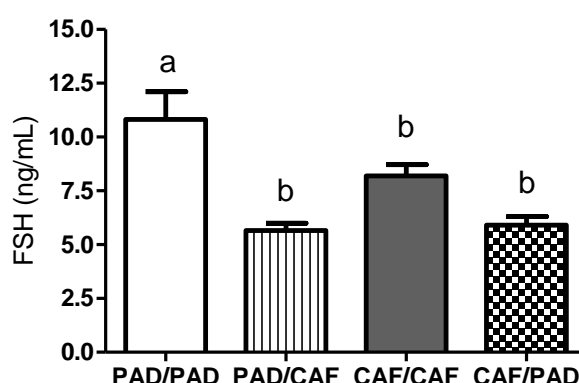
A figura 30 representa as concentrações plasmáticas de prolactina em machos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstra que não houve diferenças significativas entre os grupos ( $P<0,05$ ).



**Figura 30:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de prolactina nos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=10), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=9). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls.

#### 4.1.22 Hormônio Folículo-estimulante (FSH)

A figura 31 representa a concentração plasmática de FSH em machos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD, aos 90 dias de idade. A ANOVA de 1 via demonstra que os machos dos grupos PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD apresentaram uma redução significativa quando comparados ao grupo PAD/PAD [ $F(3,38) = 10,13$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 31:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de FSH nos descendentes machos dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/CAF (n=11), CAF/CAF (n=10) e CAF/PAD (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

#### 4.1.23 Comportamento sexual

A tabela 3 mostra as análises do comportamento sexual de ratos machos, descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que os animais dos grupos PAD/CAF, CAF/CAF e CAF/PAD exibiram aumento da latência de intromissão (s) e redução da frequência (nº) de intromissão quando comparados ao grupo PAD/PAD ( $P < 0,05$ ). Nos demais parâmetros analisados, não houve diferenças significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ ).

**Tabela 3:** Comportamento sexual dos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), CAF/PAD (n=8), CAF/CAF (n=10) e PAD/CAF (n=10). As frequências e as latências foram obtidas em sessões de observação de 20 min (1200 s). ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman - Keuls (dados paramétricos) e teste de Kruskal-Wallis com de pós-teste de Dunn (dados não paramétricos). Os valores das latências são expressos como mediana e intervalos interquartis (25 e 75) e os valores das frequências são expressos como média  $\pm$  EPM. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos ( $P < 0,05$ ).

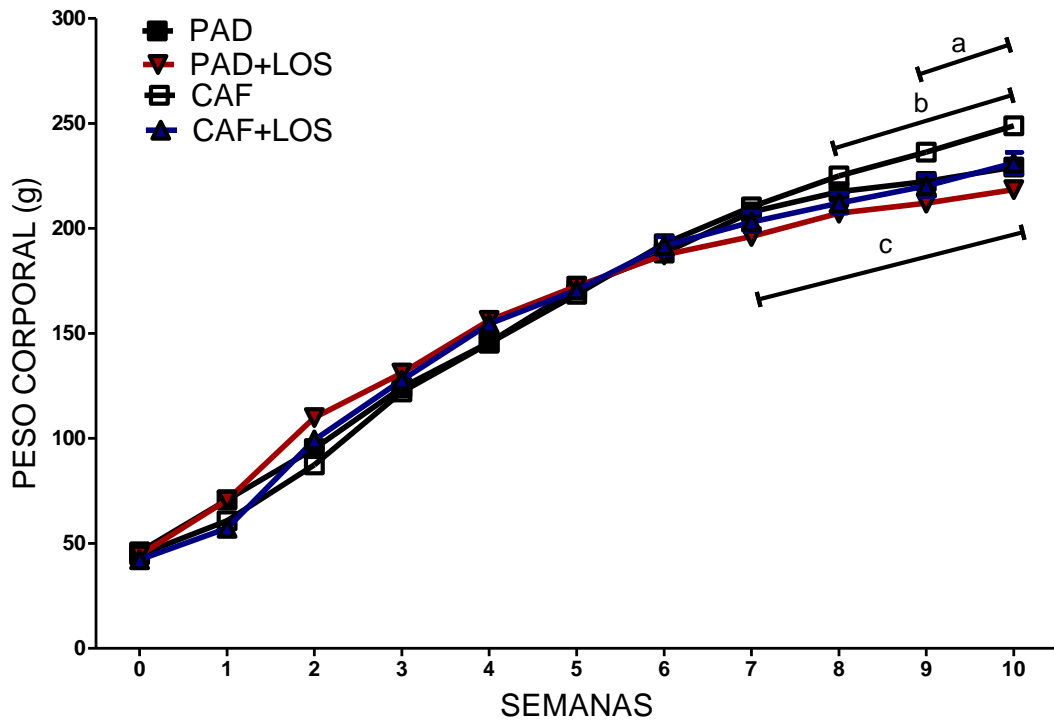
PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	PAD/PAD	PAD/CAF	CAF/CAF	CAF/PAD
Latência de monta (s)	236 168/440	655 399,8/1200	304,4 155/ 555,8	615,2 263/1200
Frequência de montas até a primeira intromissão (1200 s)	4,6 $\pm$ 1,4	5 $\pm$ 1,7	8,7 $\pm$ 2,9	6,2 $\pm$ 2,1
Latência de intromissão (s)	353 <sup>a</sup> 183,5/527	1200 <sup>b</sup> 1110/1200	1200 <sup>b</sup> 449,8/1200	1200 <sup>b</sup> 755,3/1200
Frequência de intromissão (1200 s)	22 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>	5,6 $\pm$ 4,4 <sup>b</sup>	5,2 $\pm$ 1,5 <sup>b</sup>	2,2 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>

**4.2. Efeito da associação da administração de Losartan com a dieta de cafeteria, consumida em diferentes períodos, sobre o desenvolvimento corporal e os desfechos metabólicos, hormonais e reprodutivos de ratas e suas proles.**

Dois grupos de fêmeas, Padrão (PAD+LOS) e Cafeteria (CAF+LOS), com 21 dias de vida, receberam suas respectivas dietas durante 10 semanas, associadas ao fármaco Losartan na água de beber, e tiveram seu peso corporal aferido semanalmente. Os gráficos abaixo apresentam os dados obtidos das fêmeas que receberam o fármaco, comparando-se aos grupos de fêmeas que não o receberam.

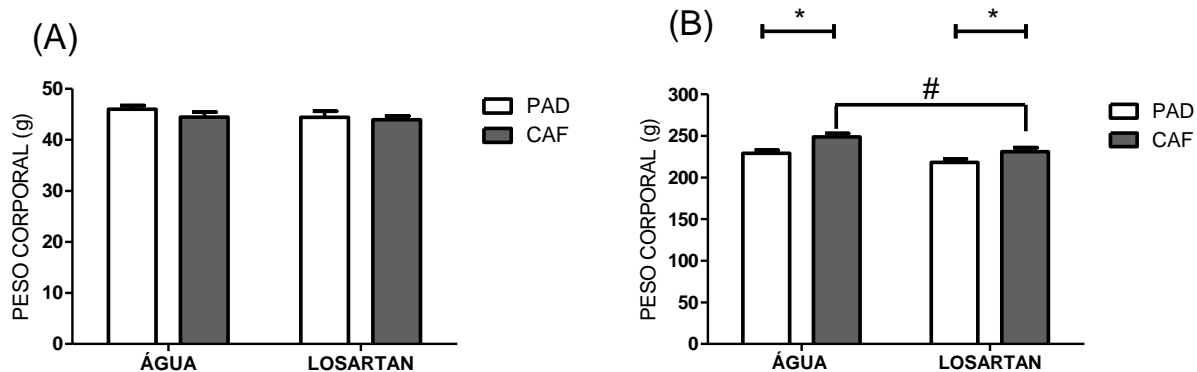
**4.2.1. Período pré-gestacional: ganho de peso corporal desde o desmame até a idade adulta.**

A figura 32 mostra a evolução do ganho de peso corporal entre os grupos PAD, PAD+LOS, CAF e CAF+LOS. A ANOVA de duas vias para medidas repetidas mostra que o ganho de peso corporal sofreu interação dos fatores tempo x tratamento [ $F(30, 960) = 14,95; P < 0,05$ ], mostra efeito somente do tempo [ $F(10, 960) = 4692; P < 0,05$ ] e mostra que não houve influência significativa somente do tratamento [ $F(3, 960) = 0,36; P > 0,05$ ]. O peso corporal do grupo CAF+LOS foi superior comparando-se ao grupo PAD+LOS ao final da nona semana ( $P < 0,05$ ) de modo semelhante ao demonstrado entre os grupos PAD e CAF a partir da oitava semana. A administração de Losartan ao grupo CAF+LOS produziu redução no ganho de peso corporal comparando-se ao grupo CAF a partir da oitava semana, tornando-o semelhante ao grupo PAD. Não foi observada diferença no ganho de peso corporal entre os grupos PAD e PAD + LOS.



**Figura 32:** Efeito da administração de Losartan associada ao consumo de dieta de cafeteria sobre a evolução do peso corporal ao longo de 10 semanas nos grupos PAD+LOS (n=25) e CAF+LOS (n=25) comparados aos grupos PAD (n=25) e CAF (n=25) do Experimento 1. Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de duas vias para medidas repetidas com pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni. a) Grupo PAD *versus* CAF; b) Grupo CAF *versus* CAF+LOS; c) Grupo PAD + LOS *versus* CAF; ( $P < 0,05$ ).

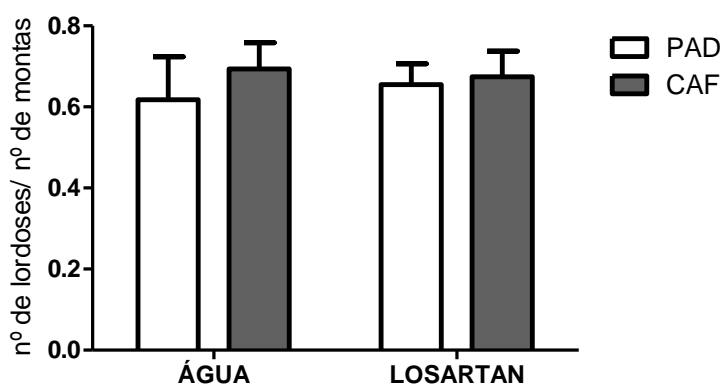
A figura 33 representa o peso corporal entre os grupos PAD, PAD+LOS, CAF e CAF+LOS ao desmame (A) e ao final de 10 semanas (B). Através da ANOVA de duas vias verificou-se que não houve diferença no peso corporal entre os grupos no início do experimento ( $P > 0,05$ ). Ao final de 10 semanas de experimento, observa-se que os grupos PAD + LOS e CAF + LOS são diferentes entre si de modo semelhante ao observado entre os grupos PAD e CAF ( $P < 0,05$ ). Entretanto, o tratamento com Losartan preveniu o ganho de peso corporal no grupo CAF + LOS, quando comparado ao grupo CAF ( $P < 0,05$ ).



**Figura 33:** Peso corporal aos 21 dias de vida (A) e aos 90 dias de vida (B) dos grupos PAD (n= 25), PAD+LOS (n=25), CAF (n=25) e CAF+LOS (n=25). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta; # Diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.2. Comportamento sexual

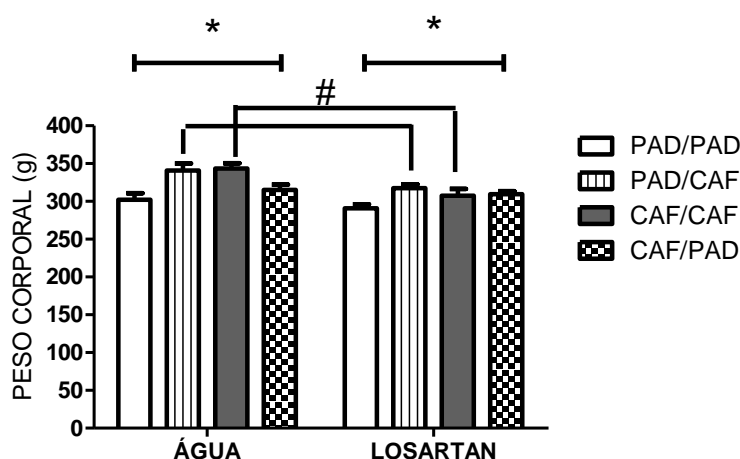
Ao final de 10 semanas de consumo de CAF ou ração padrão, na noite do proestro, as ratas dos grupos PAD+LOS e CAF+LOS foram submetidas ao teste de comportamento sexual. Ao comparar-se aos grupos PAD e CAF, a ANOVA de duas vias não indicou diferenças significativas entre os grupos ( $P > 0,05$ ), conforme representado na figura 34.



**Figura 34:** Efeito da dieta de cafeteria a partir do desmame sobre a receptividade sexual (número de lordoses/ número de montas) de ratas Wistar adultas dos grupos PAD (n=24), PAD+LOS (N=22), CAF (n=23) e CAF+LOS (n=24). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de duas vias.

### 4.2.3. Ganho de peso corporal durante a gestação

A figura 35 representa o peso corporal dos grupos no final da gestação. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,91)= 0,96$ ;  $P>0,05$ ]. Houve influência somente da dieta [ $F(3,85)= 9,29$ ;  $P<0,05$ ] e do tratamento [ $F(1,85)= 25,57$ ;  $P<0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni indica que os grupos tratados com Losartan apresentaram o mesmo padrão de diferença de peso corporal observado entre os grupos não tratados (figura 8), porém os grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS apresentam peso corporal inferior com relação aos seus respectivos controles ( $P<0,05$ ).

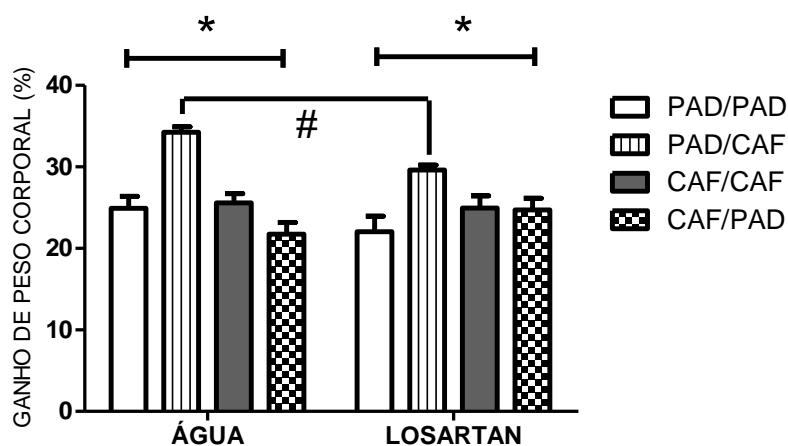


**Figura 35:** Peso corporal no final da gestação dos grupos PAD/PAD (n=12), PAD/PAD+LOS (n= 11); PAD/CAF (n=12), PAD/CAF+LOS (n=10), CAF/CAF (n=12), CAF/CAF+LOS (n=12), CAF/PAD (n=11) e CAF/PAD+LOS (n=12). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta; # diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P<0,05$ ).

A figura 36 representa o ganho percentual de peso corporal durante a gestação nas ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que houve interação entre os fatores tratamento x dieta [ $F(3,85)= 2,72$ ;  $P>0,05$ ], e que houve influência da dieta somente [ $F(3,85)= 22,01$ ;  $P<0,05$ ]. Os grupos PAD/CAF exibiram o maior percentual de ganho de peso corporal comparados aos demais



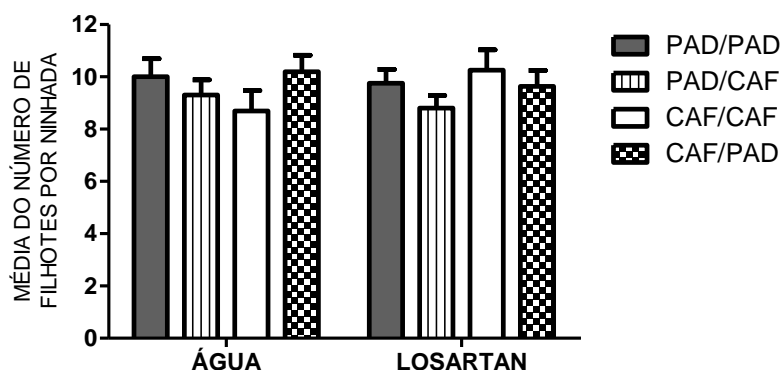
grupos, porém o grupo PAD/CAF + LOS apresentou redução no ganho de peso quando comparado ao seu controle (P<0,05).



**Figura 36:** Efeito da dieta de cafeteria sobre o percentual de ganho de peso corporal durante a gestação nas ratas dos grupos PAD/PAD (n=12), PAD/PAD+LOS (n= 11); PAD/CAF (n=12), PAD/CAF+LOS (n=10), CAF/CAF (n=12), CAF/CAF+LOS (n=12), CAF/PAD (n=11) e CAF/PAD+LOS (n=12). Valores expressos como média ± E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta; # diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0,05).

#### 4.2.4. Número de filhotes e peso das ninhadas

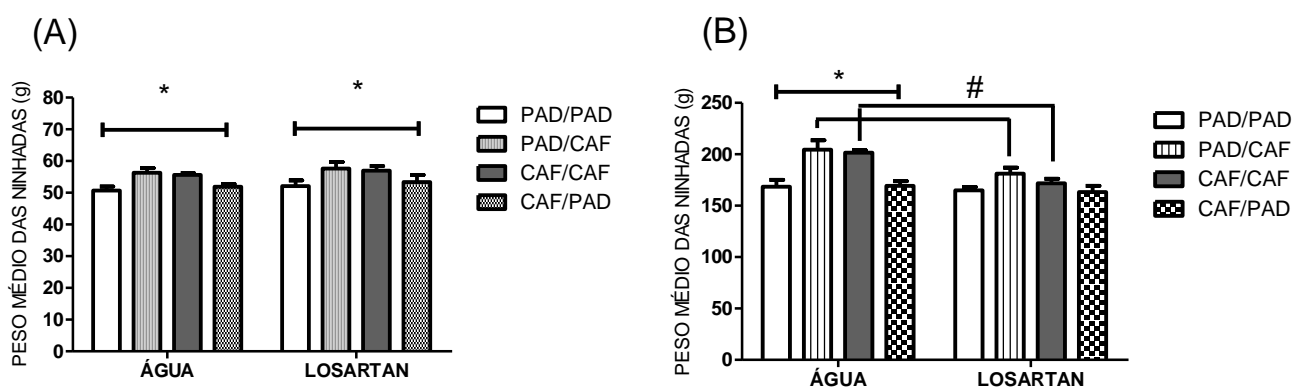
A figura 37 mostra a média do número de filhotes por ninhada. A ANOVA de duas vias indica que não houve diferença significativa entre os grupos (P>0,05).



**Figura 37:** Média no número de filhotes por ninhada, nascidos das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD+LOS (n=11), PAD/CAF (n=12), PAD/CAF+LOS(n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF+LOS (n=12), CAF/PAD (n=10) E CAF/PAD+LOS (n=11). Valores expressos como média ± E.P.M. ANOVA de 2 vias.

Após a padronização das ninhadas em número de 8 filhotes, foi verificado o peso corporal das ninhadas no 1º (A) e no 10º dia pós-natal (B). Representada na figura 38, A ANOVA de duas vias aponta que no 1º dia pós-natal não houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento ( $P>0,05$ ), assim como não houve influência do tratamento com Losartan somente ( $P>0,05$ ). Houve influência do fator dieta materna somente ( $P<0,05$ ). O pós-teste de Bonferroni demonstra que as ninhadas dos grupos PAD/CAF e CAF/CAF têm peso médio superior às ninhadas dos grupos PAD/PAD e CAF/PAD (Fig. 11), e que as ninhadas do grupo PAD/CAF+LOS apresentam peso médio superior às ninhadas do grupo PAD/PAD+LOS.

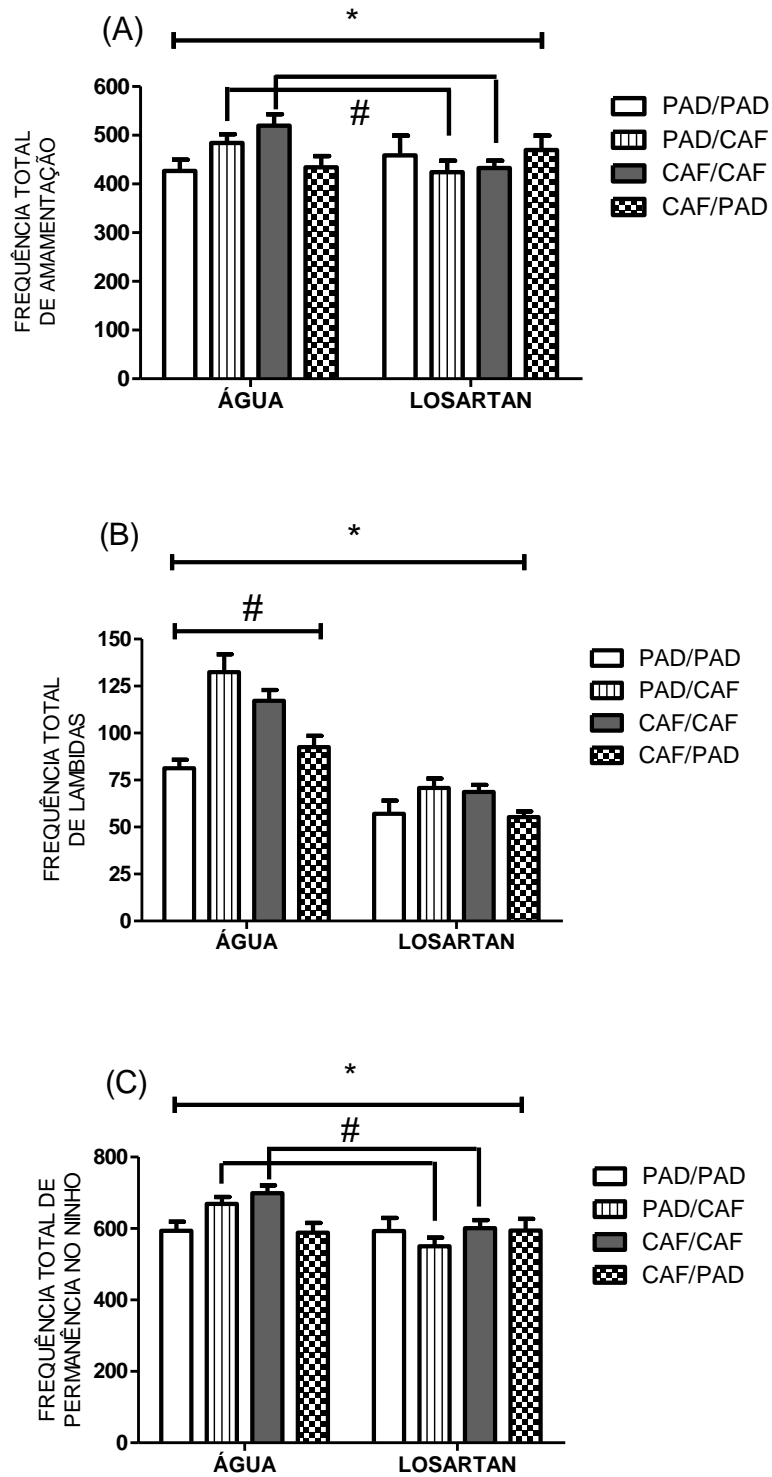
Entretanto, no 10º dia pós-natal, o tratamento com Losartan resultou em redução significativa do peso médio das ninhadas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS em comparação aos grupos CAF/CAF e PAD/CAF ( $P>0,05$ ). Além disso, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com Losartan ( $P>0,05$ ).



**Figura 38:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a média do peso das ninhadas no 1º (A) e no 10º dia pós-natal (B) nascidas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD+LOS (n=11), PAD/CAF (n=11), PAD/CAF+LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF+LOS (n=12), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=11). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta, # diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P<0,05$ ).

#### 4.2.5. Comportamento maternal

O comportamento maternal foi registrado durante os 10 primeiros dias após o nascimento das ninhadas. A figura 39A representa a frequência total do comportamento de amamentação durante os 10 primeiros dias pós-parto das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que houve interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,76) = 2,94$ ;  $P < 0,05$ ], porém não houve influência da dieta somente [ $F(3,76) = 0,57$ ;  $P > 0,05$ ] nem influência do tratamento somente [ $F(1,76) = 1,16$ ;  $P > 0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni indica que os grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS tiveram redução no comportamento de amamentação quando comparados aos grupos CAF/CAF e PAD/CAF ( $P > 0,05$ ). A figura 39B representa a frequência total do comportamento de lambidas. A ANOVA de duas vias mostra que houve interação dos fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,76) = 2,8$ ;  $P > 0,05$ ], assim como houve influência dieta materna somente [ $F(3,76) = 11,78$ ;  $P > 0,05$ ] e influência do tratamento somente [ $F(1,76) = 87,31$ ;  $P < 0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni indicou que o tratamento com Losartan reduziu a frequência do comportamento de lambida em todos os grupos tratados, com relação aos seus respectivos controles, e que não há diferença entre os grupos tratados com Losartan ( $P > 0,05$ ). A figura 39C representa a frequência total do comportamento de permanência no ninho das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que houve interação dos fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,76) = 2,87$ ;  $P > 0,05$ ], influência do tratamento somente [ $F(1,76) = 7,73$ ;  $P < 0,05$ ] e que não houve influência da dieta somente [ $F(3,76) = 2,01$ ;  $P > 0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni indica que os grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS apresentaram redução na permanência total no ninho em comparação aos grupos CAF/CAF e PAD/CAF, respectivamente ( $P < 0,05$ ).

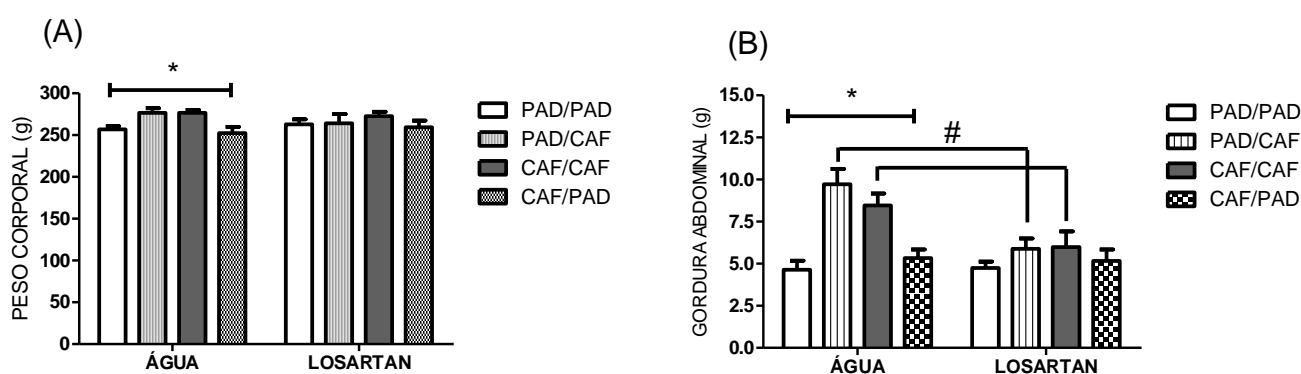


**Figura 39:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a frequência total do comportamento de amamentação (A), lambida (B) e permanência no ninho (C) durante 10 dias das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD+LOS (n=10), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF+LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF+LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=11). Valores expressos como média ± E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. A e B: \* Interação; # diferenças significativas por efeito do Losartan; C: \* interação e diferenças significativas por efeito do Losartan; # diferenças significativas por efeito da dieta (p<0,05).

#### 4.2.6. Peso corporal e gordura abdominal após o desmame dos

#### filhotes

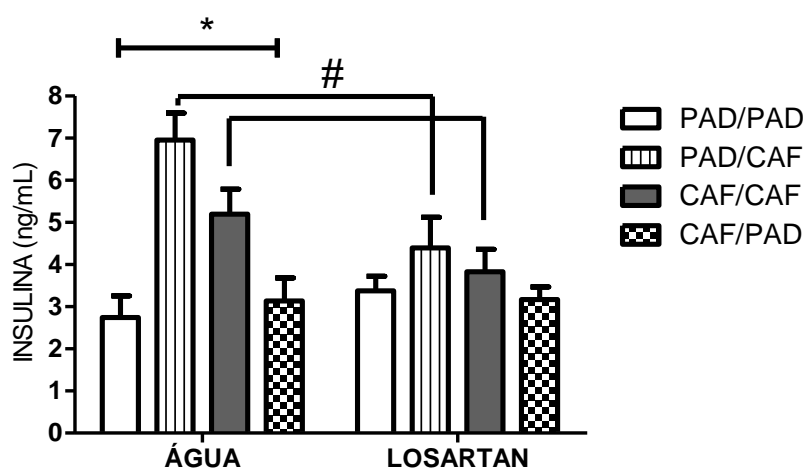
A figura 40 representa o peso corporal (A) e o peso da gordura abdominal (B) das fêmeas dos oito diferentes grupos 21 dias após o nascimento das ninhadas. Na análise do peso corporal, a ANOVA de duas vias mostra que não houve interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,73)= 0,9$ ;  $P>0,05$ ], mas houve influência somente da dieta [ $F(3,73)= 3,41$ ;  $P<0,05$ ]. O tratamento com Losartan aboliu as diferenças de peso corporal entre os diferentes grupos. Na análise do peso de gordura abdominal, a ANOVA de duas vias mostra que houve interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,73)= 3,69$ ;  $P<0,05$ ], houve influência da dieta somente [ $F(3,73)= 9,35$ ;  $P<0,05$ ] e influência do tratamento somente [ $F(1,73)= 10,52$ ;  $P<0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni indica que os grupos CAF/CAF + LOS e CAF/PAD + LOS apresentaram redução no peso de gordura abdominal em comparação aos grupos CAF/CAF e CAF/PAD ( $P<0,05$ ).



**Figura 40:** Efeito dieta de cafeteria sobre o peso corporal (A) e sobre a gordura abdominal (B) dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD+LOS (n=11), PAD/CAF (n=11), PAD/CAF+LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF+LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=11). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta, # diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P<0,05$ ).

#### 4.2.7. Insulina

A figura 41 representa as concentrações plasmáticas de insulina das ratas dos oito diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de duas vias mostra interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,67)= 3,68$ ;  $P<0,05$ ], influência da dieta somente [ $F(3,63)= 11,19$ ;  $P<0,05$ ] e influência do tratamento somente [ $F(1,63)= 4,59$ ;  $P<0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni mostra que os grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS tiveram redução na concentração plasmática de insulina comparando-se aos grupos CAF/CAF e PAD/CAF ( $P<0,05$ ).

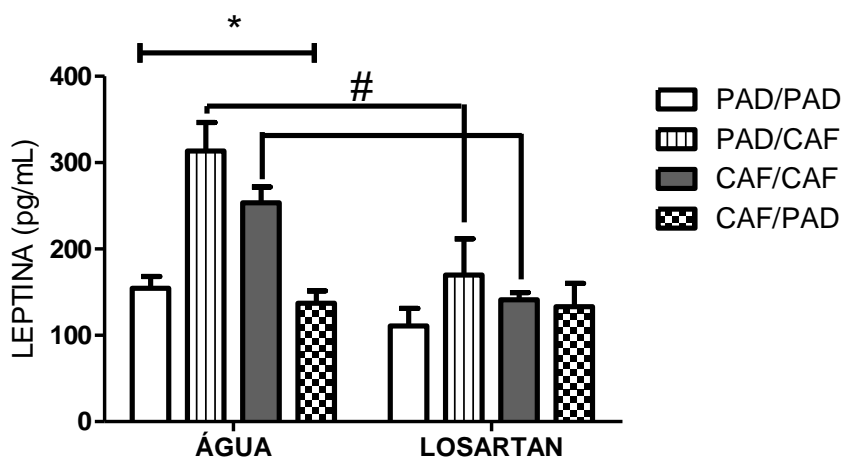


**Figura 41:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de insulina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=8), PAD/PAD+LOS (n=10), PAD/CAF (n=9), PAD/CAF+LOS (n=9), CAF/CAF (n=7), CAF/CAF+LOS (n=8), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta; # diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P<0,05$ ).

#### 4.2.8. Leptina

A figura 42 representa as concentrações plasmáticas de leptina das ratas dos oito diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de duas vias demonstrou interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,59)= 3,61$ ;  $P<0,05$ ], influência da dieta somente [ $F(3,59)= 9,49$ ;  $P<0,05$ ] e do tratamento somente [ $F(1,59)= 20,5$ ;  $P<0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni indica que os grupos

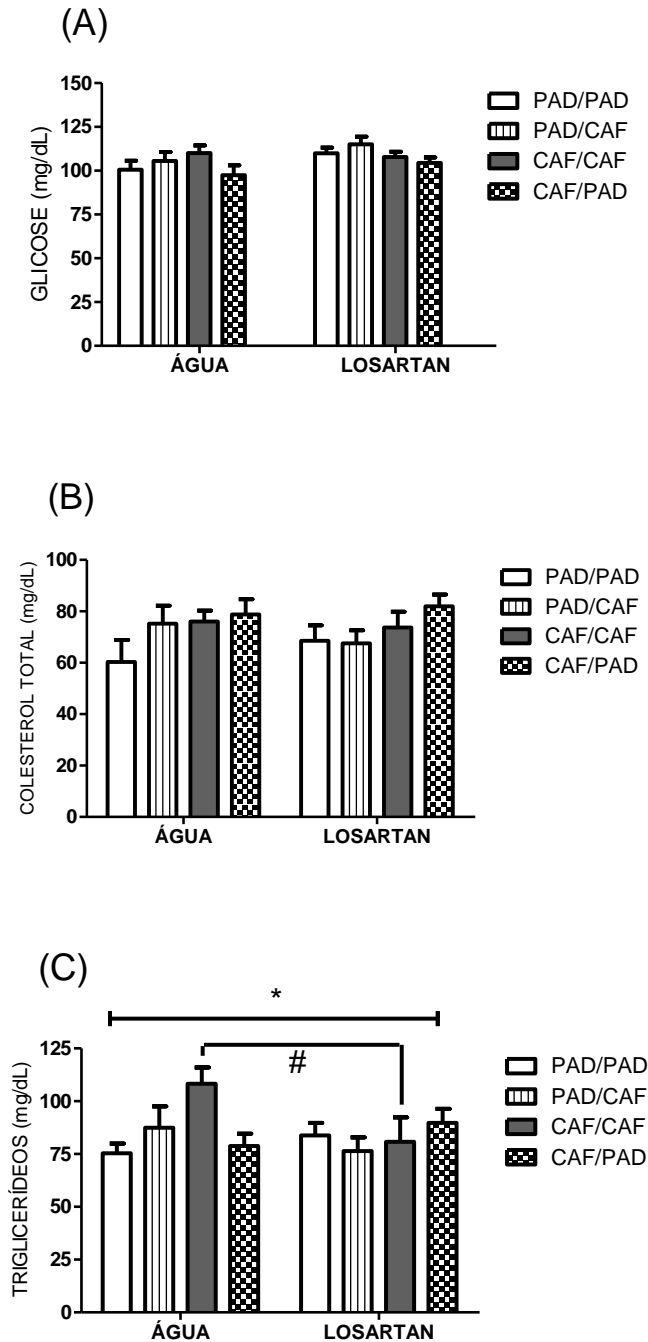
CAF/CAF + LOS e CAF/PAD + LOS apresentaram redução na concentração plasmática de leptina quando comparados aos grupos CAF/CAF e CAF/PAD ( $P < 0,05$ ).



**Figura 42:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de leptina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=8), PAD/PAD+LOS (n=9), PAD/CAF (n=6), PAD/CAF+LOS (n=8), CAF/CAF (n=7), CAF/CAF+LOS (n=9), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=9). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta; # diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2.9. Glicose, colesterol total e triglicerídeos.

A figura 43 representa as concentrações plasmáticas de glicose (A), de colesterol total (B) e de triglicerídeos (C) das ratas dos oito diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve diferenças significativas nas concentrações de glicose e de colesterol total entre os grupos ( $P > 0,05$ ). Sobre as concentrações de triglicerídeos, o mesmo teste indica interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,67) = 2,76$ ;  $P < 0,05$ ]. Entretanto, não houve influência da dieta somente [ $F(3,47) = 1,43$ ;  $P > 0,05$ ], nem influência do tratamento somente [ $F(1,67) = 0,78$ ;  $P > 0,05$ ]. O pós-teste de Bonferroni indica diminuição da concentração plasmática de triglicerídeos no grupo CAF/CAF + LOS em comparação ao grupo CAF/CAF ( $P < 0,05$ ).

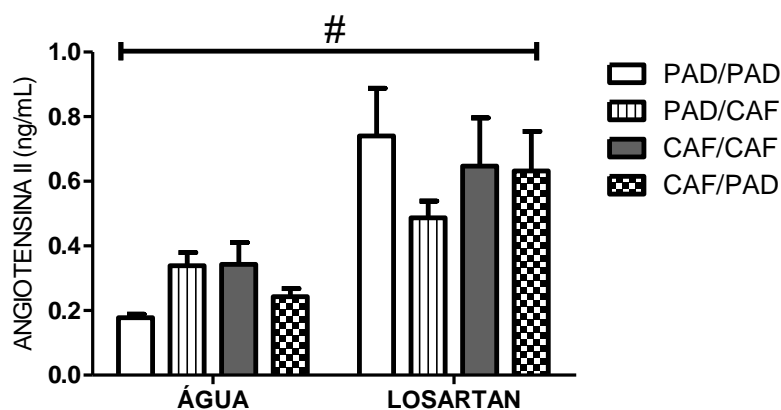


**Figura 43:** A- Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de glicose 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD+LOS (n=11), PAD/CAF (n=11), PAD/CAF+LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF+LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=11), B - Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de colesterol total 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD+LOS (n=11), PAD/CAF (n=11), PAD/CAF+LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF+LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=11); C - Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de triglicerídeos 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=8), PAD/PAD+LOS (n=10), PAD/CAF (n=9), PAD/CAF+LOS (n=9), CAF/CAF (n=9), CAF/CAF+LOS (n=9), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD+LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta; # diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P < 0,05$ ).



#### 4.2.10. Angiotensina II

A figura 44 representa as concentrações plasmáticas de ang II das ratas dos oito diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,64)= 1,94$ ;  $P>0,05$ ] e também não houve influência da dieta somente [ $F(3,64)= 0,30$ ;  $P>0,05$ ]. Entretanto, houve influência do tratamento somente [ $F(1,64)= 31,04$ ;  $P<0,05$ ], demonstrando que o tratamento com Losartan produziu aumento nas concentrações plasmáticas de ang II em todos os grupos.

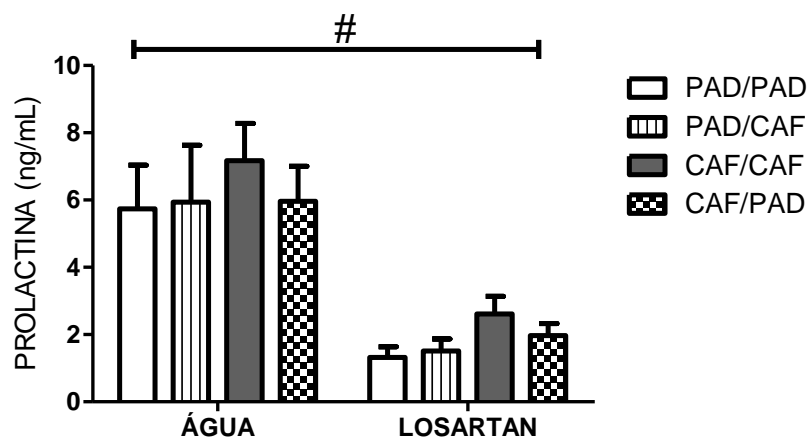


**Figura 44:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de ang II 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=9), PAD/PAD+LOS (n=8), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF+LOS (n=9), CAF/CAF (n=8), CAF/CAF+LOS (n=8), CAF/PAD (n=9) e CAF/PAD+LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 via com pós-teste de Bonferroni. # Diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P<0,05$ ).

#### 4.2.11. Prolactina

A figura 45 representa as concentrações plasmáticas de prolactina das ratas dos oito diferentes grupos, 21 dias após o nascimento das ninhadas. A ANOVA de duas vias mostrou que não houve interação entre os fatores dieta x tratamento [ $F(3,66)= 0,03$ ;  $P>0,05$ ] e não houve influência da dieta somente [ $F(3,66)= 0,72$ ;  $P>0,05$ ]. Houve influência do tratamento somente [ $F(1,66)= 40,84$ ;  $P<0,05$ ],

demonstrando que a administração Losartan produziu redução nas concentrações plasmáticas prolactina em todos os grupos.



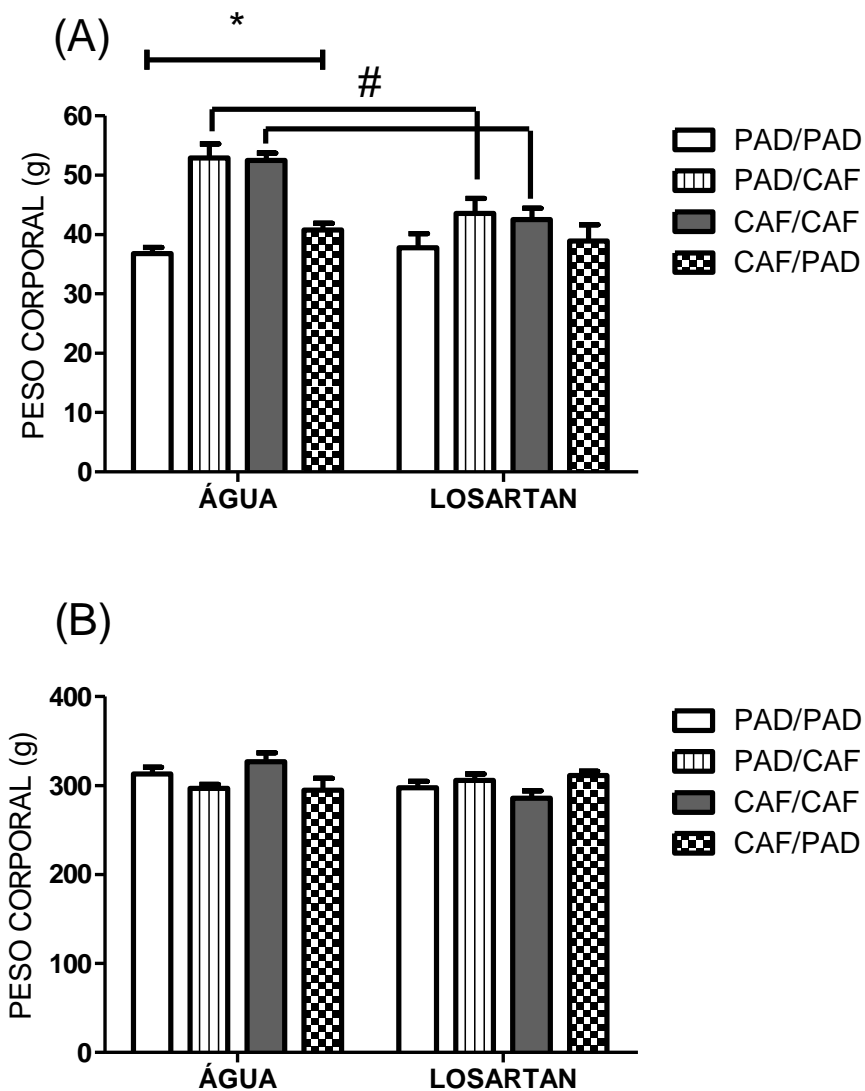
**Figura 45:** Efeito da dieta de cafeteria sobre a concentração plasmática de prolactina 21 dias após o nascimento das ninhadas das ratas dos grupos PAD/PAD (n=9), PAD/PAD+LOS (n=10), PAD/CAF (n=8), PAD/CAF+LOS (n=9), CAF/CAF (n=7), CAF/CAF+LOS (n=9), CAF/PAD (n=8) e CAF/PAD+LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. ANOVA de 2 via com pós-teste de Bonferroni. # Diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P < 0,05$ ).

A análise dos dados das proles foi iniciada com o desmame dos filhotes das ratas dos grupos PAD/PAD +LOS, PAD/CAF +LOS, CAF/CAF+LOS e CAF/PAD+LOS. Estes animais foram alimentados somente com ração padrão (consumo monitorado a cada 3 dias) e tiveram seu peso corporal aferido semanalmente.

#### 4.2.12. Peso corporal

A figura 46 representa o peso corporal dos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD, PAD/PAD + LOS, PAD/CAF, PAD/CAF + LOS, CAF/CAF CAF/CAF + LOS, CAF/PAD e CAF/PAD + LOS ao desmame (A) e aos 90 dias de vida (B). A ANOVA de duas vias mostra que ao desmame houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,72) = 3,64$ ;  $P < 0,05$ ], houve influência da dieta materna somente [ $F(3,72) = 14,74$ ;  $P > 0,05$ ] e influência do tratamento somente

[F(1,72)= 12,53; P>0,05]. O pós-teste de Bonferroni indica que o tratamento com Losartan preveniu o aumento de peso nos animais dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS em comparação aos seus controles correspondentes (P<0,05). Aos 90 dias de vida, os mesmos testes estatísticos não apontam diferenças significativas entre os diferentes grupos (P>0,05).

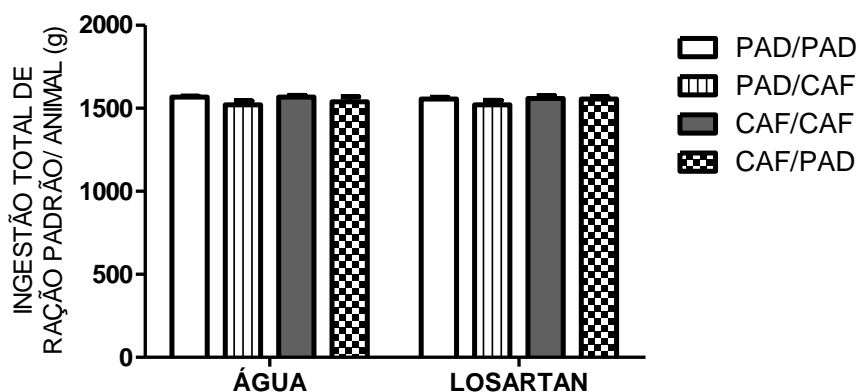


**Figura 46:** Efeito da dieta materna sobre o peso corporal ao desmame (A) e aos 90 dias de vida (B), dos descendentes das ratas dos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF + LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média ± E.P.M. Anova de 2 vias com pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta materna; # diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0,05).

#### 4.2.13. Consumo de ração padrão total desde o desmame até a idade adulta.

adulta.

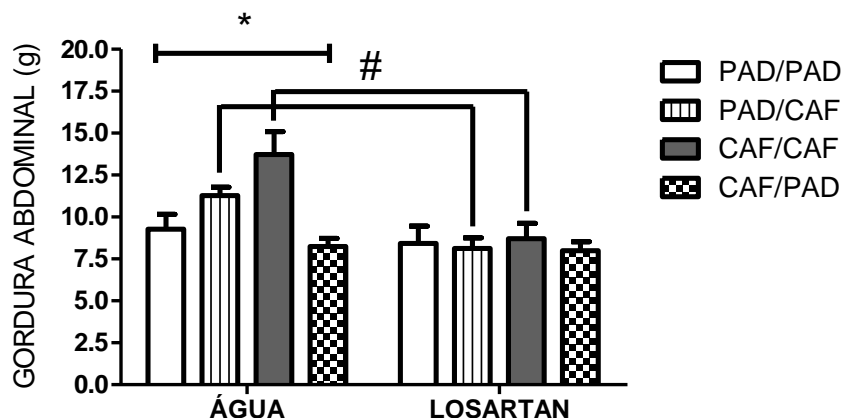
A figura 47 representa o consumo total de ração padrão dos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos A ANOVA de duas vias não mostra diferenças significativas no consumo total de ração padrão ( $P>0,05$ ).



**Figura 47:** Efeito da dieta materna sobre o consumo de ração padrão total por animal, desde o desmame até os 90 dias de vida, dos descendentes dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF + LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias.

#### 4.2.14. Gordura Abdominal

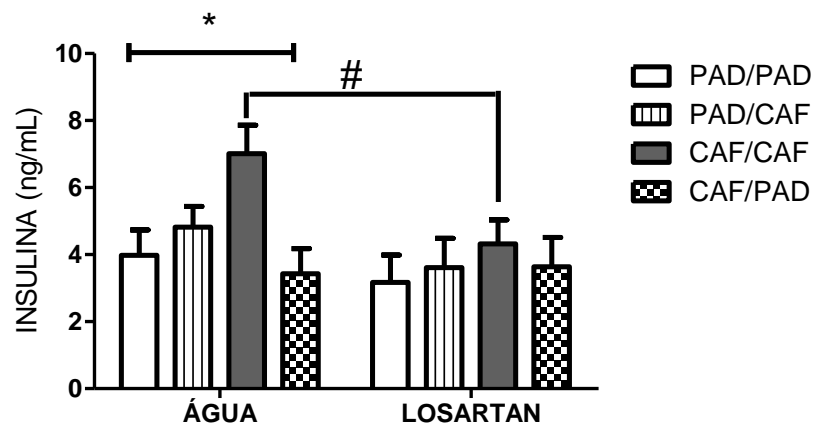
A figura 48 representa o peso do conteúdo de gordura abdominal nos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos, quando adultos. A ANOVA de duas vias mostra que houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,72)= 3,34$ ;  $P<0,05$ ], influência da dieta materna somente [ $F(3,72)= 4,95$ ;  $P<0,05$ ] e influência do tratamento somente [ $F(1,72)= 14,99$ ;  $P<0,05$ ]. O tratamento com Losartan preveniu o acúmulo de gordura abdominal nos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS comparando-se aos seus controles correspondentes ( $P<0,05$ ).



**Figura 48:** Efeito da dieta materna sobre o acúmulo de gordura abdominal nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF + LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média ± E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta materna; # diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0,05).

#### 4.2.15. Insulina

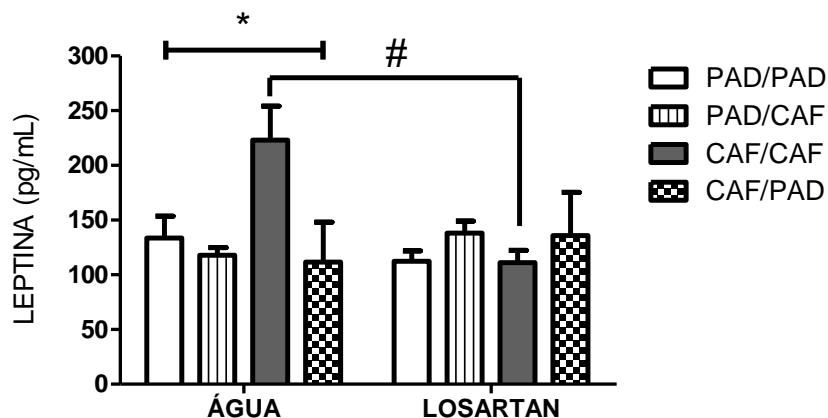
A figura 49 representa a concentração plasmática de insulina de jejum em machos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que não houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [F(3,71)= 1,17;P>0,05]. Entretanto, houve influência da dieta materna somente [F(3,71)= 3,21;P<0,05] e influência do tratamento somente [F(1,71)= 4,03;P< 0, 05]. O pós-teste de Bonferroni mostrou que houve redução na concentração de insulina no grupo CAF/CAF + LOS comparado ao grupo CAF/CAF (P<0,05).



**Figura 49:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de insulina nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=9), PAD/CAF + LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta materna; # diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0,05).

#### 4.2.16. Leptina

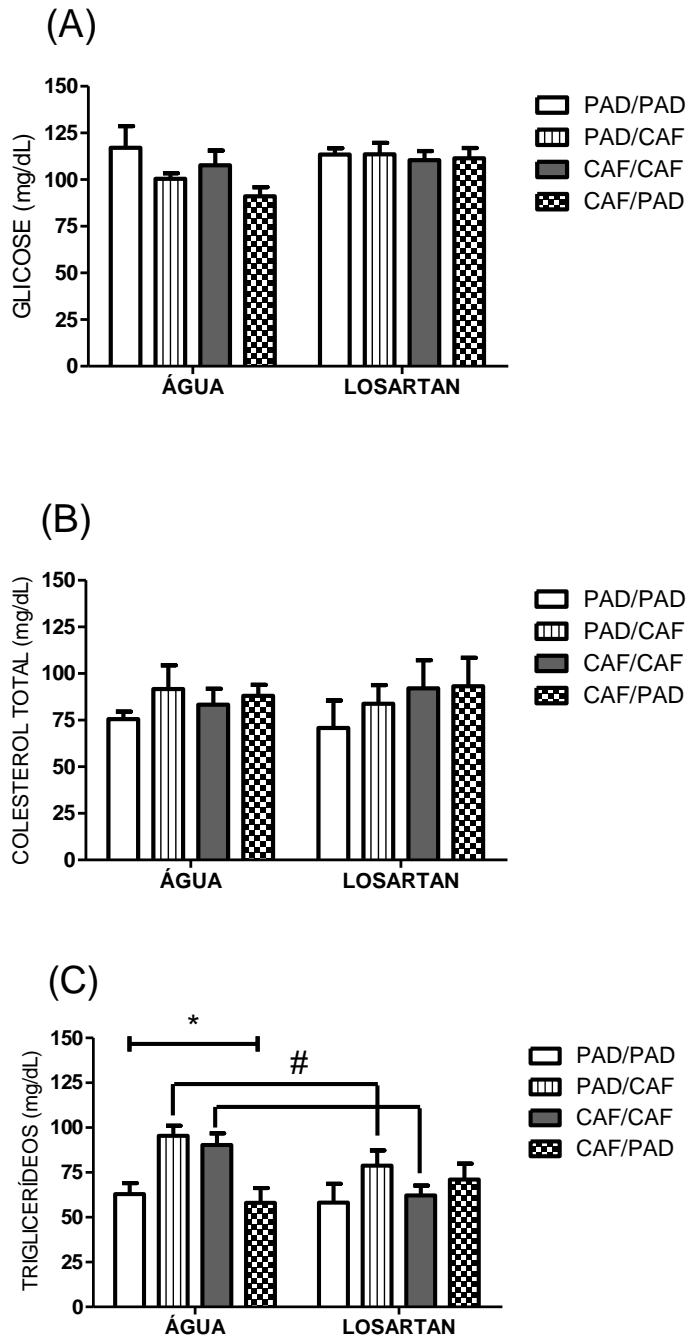
A figura 50 representa a concentração plasmática da leptina de jejum em machos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra interação dos fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,62)= 3,16$ ;  $P < 0, 05$ ]. Não houve influência da dieta materna somente [ $F(3,62)= 1,5$ ;  $P > 0, 05$ ], nem influência do tratamento somente [ $F(1,62)= 1,5$ ;  $P > 0, 05$ ]. O pós-teste de Bonferroni mostra que o tratamento com Losartan preveniu o aumento na concentração plasmática de leptina nos animais do grupo CAF/CAF + LOS quando comparado ao seu controle correspondente (P<0,05).



**Figura 50:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de leptina nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=7), PAD/CAF + LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=9), CAF/PAD (n=7) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta materna; # diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0,05).

#### 4.2.17. Glicose, colesterol total e triglicerídeos

A figura 51 representa a concentração plasmática de glicose (A), colesterol total (B) e triglicerídeos (C) de jejum, nos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que não houve diferenças significativas nas concentrações de glicose e de colesterol total entre os grupos (P>0,05). O mesmo teste indica que houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [F(3,65)= 2,84; P<0,05], houve influência da dieta materna somente [F(3,65)= 4,95; P<0,05] e que não houve influência do tratamento somente [F(1,65)= 2,91; P>0,05]. O pós-teste de Bonferroni demonstrou que o tratamento com Losartan preveniu o aumento da concentração plasmática de triglicerídeos nos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS em comparação aos seus controles correspondentes (P<0,05).

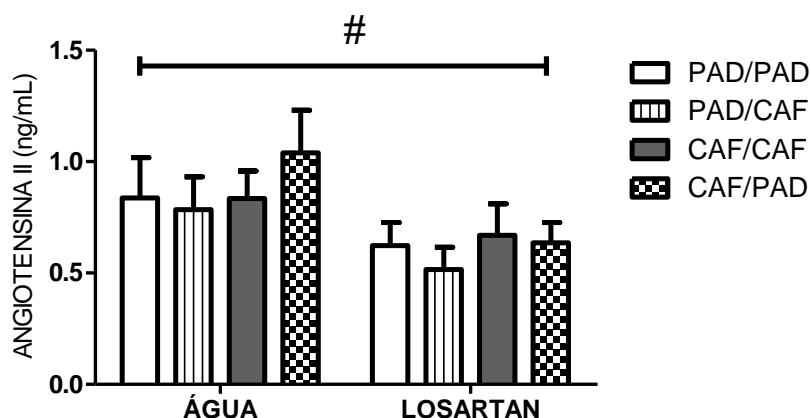


**Figura 51:** A- Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de glicose nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=9), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF + LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=10); B- Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de colesterol total nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=9), PAD/CAF (n=8), PAD/CAF + LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=9); C- Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de triglicérides nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=8), PAD/CAF (n=9), PAD/CAF + LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=9), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=9). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta materna; # diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0,05).



#### 4.2.18. Angiotensina II

A figura 52 representa a concentração plasmática de ang II nos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que não houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,70)= 0,27$ ;  $P>0,05$ ] e também não houve influência da dieta materna somente [ $F(3,70)= 0,61$ ;  $P>0,05$ ]. Entretanto, houve influência do tratamento somente [ $F(1,70)= 7,08$ ;  $P<0,05$ ], resultando em redução na concentração de ang II em todos os grupos cujas mães foram tratadas com Losartan. O pós-teste de Bonferroni não aponta diferenças entre os grupos ( $P>0,05$ ).

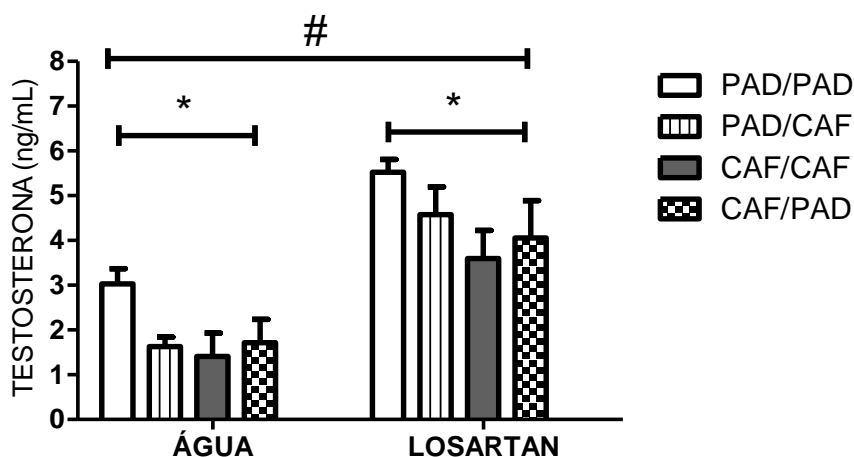


**Figura 52:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de ang II nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=9), PAD/CAF + LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=9), CAF/PAD (n=10) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. # Diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P<0.05$ ).

#### 4.2. 19. Testosterona

A figura 53 representa a concentração plasmática de testosterona nos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que não houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,66)= 0,20$ ;

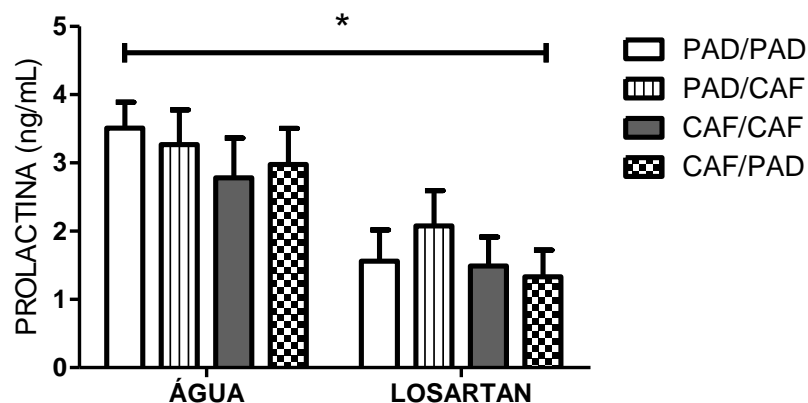
$P > 0,05$ ]. Houve influência da dieta materna somente [ $F(3,66) = 4,54$ ;  $P < 0,05$ ] e influência do tratamento somente [ $F(1,66) = 45,47$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 53:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de testosterona nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD ( $n=10$ ), PAD/PAD + LOS ( $n=10$ ), PAD/CAF ( $n=10$ ), PAD/CAF + LOS ( $n=9$ ), CAF/CAF ( $n=10$ ), CAF/CAF + LOS ( $n=9$ ), CAF/PAD ( $n=7$ ) e CAF/PAD + LOS ( $n=9$ ). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta materna; # diferenças significativas por efeito do Losartan ( $P < 0,05$ ).

#### 4.2. 20. Prolactina

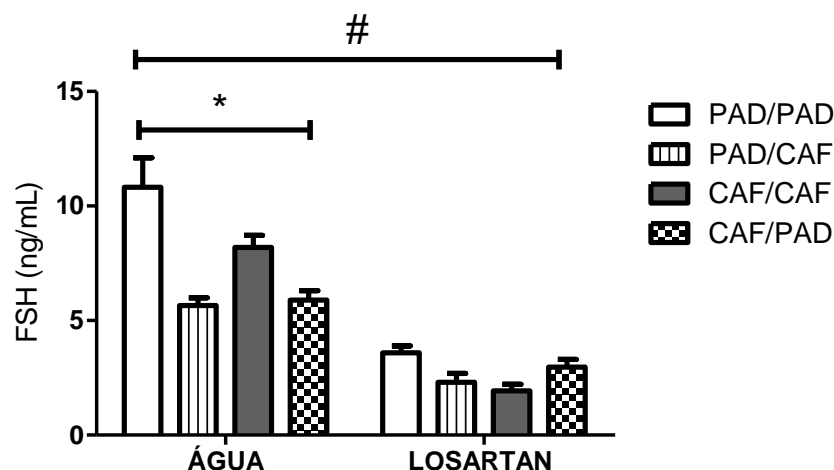
A figura 54 representa a concentração plasmática de PRL nos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que não houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,69) = 0,26$ ;  $P > 0,05$ ], nem influência da dieta materna somente [ $F(3,69) = 0,64$ ;  $P < 0,05$ ]. No entanto, o tratamento com Losartan, nas mães, produziu redução nas concentrações plasmáticas de PRL nas proles de todos os grupos [ $F(1,60) = 20,12$ ;  $P < 0,05$ ].



**Figura 54:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de prolactina nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=9), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF + LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=9) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0.05).

#### 4.2. 21 Hormônio Folículo-estimulante (FSH)

A figura 55 representa a concentração plasmática de FSH nos descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. A ANOVA de duas vias mostra que houve interação entre os fatores dieta materna x tratamento [ $F(3,70)= 6,62$ ;  $P<0,05$ ], houve influência da dieta materna somente [ $F(3,70)= 12,11$ ;  $P<0,05$ ] e influência do tratamento somente [ $F(1,70)= 143$ ;  $P<0,05$ ], o qual produziu redução nas concentrações plasmáticas de FSH em todos os grupos.



**Figura 55:** Efeito da dieta materna sobre a concentração plasmática de FSH nos descendentes das ratas dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF + LOS (n=9), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10), CAF/PAD (n=9) e CAF/PAD + LOS (n=10). Valores expressos como média  $\pm$  E.P.M. Anova de 2 vias com de pós-teste de Bonferroni. \* Diferenças significativas por efeito da dieta materna; # interação e diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0.05).

#### 4.2. 22. Comportamento sexual

A tabela 4 mostra as análises do comportamento sexual de ratos machos, descendentes das ratas dos oito diferentes grupos. O tratamento com Losartan promoveu redução nas latências de monta nos grupos PAD/PAD + LOS, PAD/CAF + LOS e CAF/PAD + LOS; redução nas frequências de monta até a primeira intromissão nos grupos CAF/CAF + LOS e CAF/PAD + LOS; redução nas latências de intromissão em todos os grupos tratados e aumento das frequências de intromissão nos grupos PAD/CAF + LOS, CAF/CAF+LOS e CAF/PAD + LOS (P<0,05).

PARÂMETROS COMPORTAMENTAIS	PAD/PAD		PAD/CAF		CAF/CAF		CAF/PAD	
	Controle X Losartan	Controle X Losartan	Controle X Losartan	Controle X Losartan	Controle X Losartan	Controle X Losartan	Controle X Losartan	Controle X Losartan
Latência de monta (s)	236 (168/440)	103* (42,5/136)	655 (399/1200)	86,5* (41,2/199)	304,4 (155/555,8)	200 (39,5/711)	615,2 (263/1200)	152,5* (93,5/369,3)
Frequência de montas até a primeira intromissão (1200 s)	4,6 ± 1,4	3,5 ± 0,6	5 ± 1,7	3,3 ± 1,2	8,7 ± 2,9	2,8 ± 2*	6,2 ± 2,1	2,5 ± 1*
Latência de intromissão (s)	353 (183,5/527)	141* (59,5/211)	1200 (1110/1200)	234,5* (174/334)	1200 (449,8/1200)	424,3* (207/1200)	1200 (755,3/1200)	378,5* (263,3/715,5)
Frequência de intromissão (1200 s)	22 ± 3,1	22,1 ± 2,3	5,6 ± 4,4	15 ± 2,8*	5,2 ± 1,5	15,7 ± 1,8*	2,2 ± 1,6	8,62 ± 2,52*

Tabela 4: Comportamento sexual de ratos dos grupos PAD/PAD (n=10), PAD/PAD + LOS (n=10), PAD/CAF (n=10), PAD/CAF + LOS (n=10), CAF/CAF (n=10), CAF/CAF + LOS (n=10) E CAF/PAD (n=10). As frequências e as latências foram obtidas em sessões de observação de 20 min (1200 s). Teste t de Student (dados paramétricos) para frequências e teste de Mann-Whitney (dados não paramétricos) para as latências. Os valores das latências são expressos como mediana e intervalos interquartis (25 e 75) e os valores das frequências são expressos como média ± EPM. \* diferenças significativas por efeito do Losartan (P<0,05).

## 5. DISCUSSÃO

Através de estudos realizados em humanos e em animais, a literatura tem mostrado que a obesidade materna pode resultar em distúrbios de fertilidade, aumento do risco de complicações na gestação e no parto, também podendo produzir diversas consequências negativas sobre o desenvolvimento da prole. De fato, descendentes de mães obesas muitas vezes apresentam um fenótipo alterado, caracterizado por síndrome metabólica, comportamento hiperfágico e obesidade, ocorrendo tanto em humanos como em modelos animais (Nivoit *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011). Além da obesidade materna prévia à gestação, o ganho de peso corporal durante a gestação também tem sido apontado como fator de risco para o desenvolvimento destas alterações (Oken *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011).

No presente experimento, o objetivo foi investigar a magnitude do impacto produzido pelo consumo materno de dieta de cafeteria desde o desmame até a prenhez, somente durante a prenhez e lactação, ou em todo o período desde o desmame das ratas até o final do período de lactação, e, em seguida, os seus efeitos sobre diferentes aspectos do desenvolvimento da prole. Nas mães, foi avaliado o ganho de peso corporal durante o período pré-gestacional, o comportamento sexual, o ganho de peso durante a gestação, o número de filhotes por ninhada, o peso das ninhadas ao nascimento, aos 10 dias de vida e no momento do desmame (21 dias após o nascimento), e também o comportamento maternal nos primeiros 10 dias após o nascimento dos filhotes. Após o desmame dos filhotes, foram avaliados, nas ratas, o peso corporal, o conteúdo de gordura abdominal, as concentrações plasmáticas de insulina, leptina, glicose, triglicerídeos, colesterol total, prolactina e de angiotensina II. Nos filhotes machos foram avaliados o

desenvolvimento corporal e a ingestão alimentar até os 90 dias de vida, momento em que foi avaliada a função reprodutiva por meio do teste de comportamento sexual. Na manhã seguinte ao teste comportamental, os animais foram sacrificados, e foram analisados o peso corporal, o conteúdo de gordura abdominal, as concentrações plasmáticas de glicose, triglicerídeos, colesterol total, de insulina, leptina, angiotensina II e de hormônios envolvidos no processo reprodutivo (prolactina, testosterona e hormônio folículo-estimulante- FSH).

Com relação às mães, devemos ressaltar que o modelo de dieta de cafeteria utilizado neste trabalho mostrou-se eficiente na indução de obesidade, conforme previamente descrito (Prada *et al.*, 2005; Kretschmer *et al.*, 2005; Sampey *et al.*, 2011). Tendo partido de pesos corporais iguais no momento do desmame, foi observado que, ao final de 10 semanas de administração de dieta de cafeteria, as ratas do grupo CAF apresentaram peso corporal superior em relação ao grupo PAD (controle).

Ao analisarmos a receptividade sexual, examinada através do quociente de lordose, não foram observadas diferenças entre os grupos. Estes dados estão de acordo com achados prévios obtidos em nosso laboratório (Sagae *et al.*, 2012), indicando que este aspecto do processo reprodutivo parece não ser afetado pelo consumo de CAF.

Na avaliação do ganho de peso corporal durante a gestação, observamos que as ratas que passaram a receber dieta de cafeteria (grupo PAD/CAF) a partir do primeiro dia de gestação apresentaram um maior percentual no ganho de peso corporal. Deste modo, ao final de 21 dias de gestação este grupo apresentou peso corporal semelhante ao grupo CAF/CAF (caracterizado pelo consumo de dieta de cafeteria desde o seu desmame até o final da lactação) indicando que a

administração desta dieta por um período de três semanas foi capaz de aumentar significativamente o peso corporal durante a gestação. De modo inverso, observamos que o grupo em que foi suspensa a administração de dieta de cafeteria a partir do primeiro dia de gestação (grupo CAF/PAD) não apresentou uma evolução de peso corporal estatisticamente diferente dos demais grupos, porém, ao final de 21 dias, o peso corporal mostrou-se semelhante ao grupo PAD/PAD, e menor quando comparado aos grupos CAF/CAF e PAD/CAF.

O número de concepções não foi modificado pela dieta de cafeteria, de forma semelhante ao observado por outros autores, em ratas alimentadas com dieta hiperlipídica (*High-fat diet*, HFD) (Purcell *et al.*, 2011). Por um lado, fêmeas obesas tendem a apresentar aumento no número de filhotes por ninhada (Nivoit *et al.*, 2009), e, por outro, há uma redução no número de oócitos (Sagae *et al.*, 2012). Porém, as ninhadas das ratas que consumiram a dieta no período pré-gestacional + prenhez + lactação (CAF/CAF) e das que a consumiram somente durante a prenhez + lactação (PAD/CAF) exibiram aumento de peso corporal no primeiro dia pós-natal (DPN 1), quando comparadas aos demais grupos (CAF/PAD e PAD/PAD). Estes dados apontam a influência da obesidade e da alimentação materna durante o período gestacional e na lactação para a determinação de um alto peso ao nascimento, confirmando a “hipótese da sobrenutrição fetal” sugerida por Nivoit e colaboradores (2009), que associa o alto peso ao nascimento ao aumento da oferta de nutrientes no ambiente intrauterino. Embora normoglicêmicas, as ratas destes grupos (PAD/CAF e CAF/CAF) exibiram um quadro de hiperinsulinemia (observado 21 dias após o nascimento dos filhotes), indicando uma possível resposta compensatória da insulina frente à sobrecarga de glicose, lipídeos e carboidratos ingeridos com a dieta de cafeteria (Prada *et al.*, 2005); ainda, que a administração



da dieta no início da gestação produziu um importante efeito agudo sobre a concentração de insulina, de modo que o grupo PAD/CAF apresentou a maior concentração deste hormônio. Embora não tenhamos avaliado as concentrações de glicose e insulina durante a prenhez e lactação, não podemos descartar a instalação de um quadro de diabetes gestacional durante esse período, especialmente no grupo CAF/CAF. Sabe-se que o aumento das concentrações de glicose e lipídeos na mãe estimula o pâncreas fetal a secretar quantidades exageradas de insulina, e o fígado fetal a produzir níveis mais elevados de fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs). A hiperinsulinemia fetal, por sua vez, estimula o crescimento de tecido adiposo no feto e de outros tecidos sensíveis à insulina, frequentemente induzindo a macrosomia (Catalano *et al.*, 2003; Simmons *et al.*, 2008). É interessante observarmos que as ninhadas do grupo CAF/PAD não apresentaram aumento de peso ao nascimento, embora as mães tenham iniciado o período gestacional com peso corporal aumentado. Em associação a estes achados, observamos que as concentrações plasmáticas de insulina e de leptina estavam estatisticamente semelhantes ao grupo PAD/PAD (controle) no momento do desmame dos filhotes. Esses dados indicam que a administração de dieta de cafeteria durante a gestação tem um efeito importante sobre o metabolismo materno e conseqüentemente sobre o desenvolvimento fetal, bem como, que a suspensão desta dieta a partir do início da gestação pode reverter o quadro de obesidade materna ao longo da gestação e também prevenir o alto peso da prole ao nascimento.

O aumento do peso corporal nas ninhadas dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF tornou-se ainda mais evidente no décimo dia pós-natal (DPN 10), quando comparados aos demais grupos. Neste momento, devemos considerar dois pontos

importantes. O primeiro deles é que, uma vez apresentando um alto peso ao nascimento, há forte tendência deste sobrepeso persistir durante a infância e a idade adulta em humanos, podendo, até mesmo, conduzir a um quadro de obesidade (Simmons, 2008), e o mesmo tem sido observado em estudos em animais (Nivoit et al., 2009). O segundo ponto refere-se aos resultados obtidos no registro do comportamento maternal, cujo objetivo foi verificar as influências das características do ambiente neonatal como fator predisponente ao desenvolvimento de obesidade na prole. Foi observado que as ratas dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF (cujos filhotes apresentaram aumento de peso corporal) exibiram aumento significativo no cuidado maternal, representado através do aumento das frequências de amamentação, de lambidas e consequente aumento na frequência de permanência no ninho, ao longo de 10 dias de registro, quando comparados aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD. Isso causaria um aumento na oferta de alimento (leite materno), o que poderia justificar o ganho de peso nos filhotes durante esse estágio.

Não havendo modificações nas concentrações de PRL, o que poderia ser um indicador hormonal do comportamento maternal, uma possível explicação para o aumento do cuidado maternal nestas ratas pode ser dada por meio da sinalização hipotalâmica exercida pela leptina como marcador do estado metabólico (Ahima *et al.*, 1996). Desta forma, a leptina secretada pelos adipócitos, e cuja concentração sérica está aumentada nestes grupos, poderia estar agindo diretamente sobre a área pré-óptica medial (APOM), uma importante área reguladora do comportamento maternal (Numan, 2006), pois, de fato, há receptores de leptina nesta área (Mercer, 1996; Scott *et al.*, 2009). No presente estudo, sugerimos a hipótese de que a hiperleptinemia agiria nesta área, e que a “sinalização” de um ambiente rico em energia poderia representar um fator estimulador do cuidado materno.

Porém, considerando que a amamentação é um ato tipicamente reflexo, envolvendo uma postura arqueada que é iniciada pelos filhotes quando estes estão presos aos mamilos (Stern & Johnson, 1990), é plausível considerarmos que o aumento da frequência de amamentação seja um efeito produzido pelos próprios filhotes. Tal efeito poderia ser em decorrência de um possível aumento da palatabilidade do leite materno, aumentando a procura dos filhotes pelo leite, ou, até mesmo, da existência de um padrão hiperfágico nestes filhotes. Para confirmarmos esta hipótese, no entanto, seria necessária a realização de um teste de ingestão alimentar independente nos filhotes, em que os ratos lactentes são separados da mãe e colocados em incubadora. A ingestão alimentar é estimada por meio da análise do peso corporal antes e após 30 minutos decorridos da exposição dos filhotes a um pedaço de papel-filtro embebido em leite (Blumberg *et al.*, 2006). De qualquer forma, a lactação em si desempenha um papel crítico no desenvolvimento corporal da prole, já que nas primeiras semanas de vida o leite é o alimento exclusivo do neonato (Drewet *et al.*, 1974). Além do tempo que a mãe disponibiliza para amamentar, é importante considerarmos a composição nutricional do leite materno. Ao analisar a composição do leite de ratas com obesidade induzida pela dieta de cafeteria, ou que a receberam durante a prenhez e lactação, foi observado um aumento no conteúdo de gordura, proteína e conteúdo calórico bruto, diminuição do conteúdo de água, não havendo diferença no conteúdo de açúcares (Rolls & Gurr, 1986) quando comparados a animais que foram alimentados com ração padrão durante a prenhez e lactação. É importante, ainda, considerarmos que no modelo de dieta de cafeteria aplicado neste trabalho, também foi ofertado o refrigerante, o que poderia contribuir sensivelmente para um aumento do conteúdo de açúcares no leite materno. De um modo geral, esses achados sugerem a

influência da dieta materna sobre a composição do leite ofertado à prole, indicando que este também poderia ser um importante aspecto contribuinte para o ganho de peso corporal precocemente observado nos descendentes de mães que ingeriram a dieta de cafeteria durante o período de lactação. Deste modo, seria bastante oportuna a inserção de um grupo experimental caracterizado pelo consumo de dieta de cafeteria somente durante a lactação.

Além disto, em associação ao aumento da frequência de amamentação foi observado um aumento na frequência do comportamento de lambidas nas ratas que receberam dieta de cafeteria durante a lactação. Ao considerarmos que o comportamento de lamber o corpo do filhote é um comportamento motivado e que depende da ação hormonal sobre a APOM (Stern, 1997), julgamos necessária uma melhor investigação acerca dos possíveis efeitos deste modelo de dieta sobre a estimulação desta área, a exemplo de uma possível ação direta da leptina, conforme sugerimos anteriormente.

Logo após o desmame dos filhotes, observamos que as mães dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF exibiram aumento do peso corporal, do conteúdo de gordura abdominal e das concentrações plasmáticas de insulina, leptina e triglicérides. Esses achados estão de acordo com a literatura (Prada *et al.*, 2005; Kretschmer *et al.*, 2005; Sampey *et al.*, 2011), demonstrando que a dieta de cafeteria é um modelo experimental animal confiável para a indução da obesidade e suas respectivas alterações endócrinas e metabólicas. Neste estudo, os animais dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF exibiram hiperinsulinemia de jejum, conforme demonstrado em trabalhos prévios que apontam que a obesidade promove a resistência à insulina em modelos experimentais animais (Prada *et al.*, 2005), assim como em humanos (Chopra *et al.*, 2002). Os animais destes grupos apresentaram-se normoglicêmicos,

certamente em resposta ao aumento compensatório de insulina observado neste trabalho e em outros (Prada *et al.*, 2005, Martins *et al.*, 2008). Além disso, o aumento do conteúdo plasmático de leptina é um importante indicador do aumento de gordura abdominal, por se tratar de um hormônio secretado pelo tecido adiposo e que atua na sinalização hipotalâmica sobre o estoque energético, de modo que sua concentração plasmática é diretamente proporcional ao conteúdo de gordura abdominal (Zhang *et al.*, 1994; Ehrhardt *et al.*, 2001; Levin, 2004). Em associação a estes achados, observamos que não houve modificações no conteúdo plasmático de colesterol total nos grupos CAF/CAF e PAD/CAF. Sagae e colaboradores (2013) também observaram que não há alteração no conteúdo de colesterol total após 10 semanas de administração de dieta de cafeteria, embora tenham sido observados redução do conteúdo de colesterol HDL e aumento do colesterol LDL. Entretanto, estes mesmos grupos (CAF/CAF e PAD/CAF) exibiram hipertrigliceridemia. Como o aumento sérico dos triglicérides é resultante do excesso de calorias, especialmente oriundas da ingestão de carboidratos (Grundy, 1998), o aumento do seu conteúdo observado nestes grupos também é indicador dos efeitos da dieta de cafeteria sobre o metabolismo energético.

Damos especial atenção ao aumento do conteúdo plasmático de ang II observado nas ratas dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF, acima descritos. Este achado é particularmente importante, uma vez que não está associado aos efeitos classicamente associados a este peptídeo, como redução da pressão arterial e do conteúdo de sódio dos fluidos corporais (Reid *et al.*, 1978; Saavedra, 1992; Dzau & Re, 1994; Beevers *et al.*, 2001; Ferrario, 2006). Este achado confirma as observações de trabalhos prévios que apontam que o tecido adiposo, que é um órgão endócrino ativo que produz diversos hormônios, também produz e secreta ang

II, de modo que os componentes do RAS estão aumentados no plasma de indivíduos obesos (Licata *et al.*, 1994; Unemura *et al.*, 1997; Goodfreind *et al.*, 1999; Engeli *et al.*, 2005), sugerindo ainda a sua participação no desencadeamento de diversas desordens relacionadas à obesidade, como hipertensão, aterosclerose (Carlson *et al.*, 2000; Mundy *et al.*, 2007), resistência à insulina e DM2 (Goossens *et al.*, 2003; Henriksen 2007; Leung, 2007; Olivares-Reyes *et al.*, 2009). De fato, no presente trabalho, observamos uma correlação fortemente positiva entre o conteúdo de gordura abdominal e a concentração sérica de ang II.

Em contrapartida, as ratas que tiveram suspensa a administração de dieta de cafeteria a partir do primeiro dia de gestação (grupo CAF/PAD) exibiram um perfil endócrino e metabólico semelhante ao grupo PAD/PAD (controle). Conforme trabalho de Goularte e colaboradores (2012), ratas que receberam dieta de cafeteria durante 26 semanas exibiram perda de peso, de gordura abdominal e o retorno das concentrações plasmáticas de insulina a níveis semelhantes aos animais controle após oito semanas de interrupção do consumo da dieta. Estes dados indicam que as modificações endócrinas e metabólicas induzidas pelo consumo da dieta de cafeteria podem ser plenamente revertidas após algumas semanas de consumo exclusivo de ração padrão. No presente trabalho, essa reversão pode ser observada em cerca de seis semanas, período iniciado no primeiro dia de gestação e que se estendeu até o desmame das ninhadas.

Com relação aos desfechos observados na prole, é importante salientarmos que a prole oriunda de cada grupo experimental consumiu apenas água e ração padrão *ad libitum* desde o desmame até a idade adulta, de modo que a administração de dieta de cafeteria restringiu-se às mães.

No vigésimo primeiro dia pós-natal (DPN 21), as ninhadas foram desmamadas e o peso corporal manteve-se aumentado nos filhotes dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF; porém, essas diferenças desapareceram nas duas semanas seguintes, de modo que, aos 90 dias, não houve diferença de peso corporal entre os quatro grupos analisados. Entretanto, quando adultos, os descendentes das mães do grupo CAF/CAF exibiram aumento significativo no conteúdo de gordura abdominal, nas concentrações plasmáticas de insulina, leptina e triglicérides, ao passo que os descendentes das mães dos grupos PAD/CAF apresentaram aumento na concentração plasmática de triglicérides de forma semelhante ao grupo CAF/CAF, seguido de discreta elevação no conteúdo plasmático de insulina e de gordura abdominal, porém não de forma semelhante ao grupo CAF/CAF e também não de forma significativamente diferente em relação aos demais grupos (PAD/PAD e CAF/PAD). Esses dados demonstram que a administração de dieta de cafeteria às mães apenas no período de gestação + lactação (PAD/CAF) não produziu o mesmo impacto a longo prazo sobre a prole comparando-se ao grupo que recebia a dieta no período pré-gestacional + prenhez + lactação (CAF/CAF), diferentemente de estudos que demonstram que a ingestão de dieta hiperlipídica (HFD) somente durante a prenhez + lactação exerce efeitos sobre a prole de modo semelhante às mães que já ingeriam essa dieta antes da concepção (Howie *et al.*, 2009). Sobre este aspecto, devemos considerar que o início da gestação nas ratas do grupo CAF/CAF poderia ter sido caracterizado por um estado fisiológico já alterado, influenciando o desenvolvimento fetal a partir da concepção. Embora tenhamos observado um importante efeito da administração de dieta de cafeteria a partir do início da gestação + lactação (grupo PAD/CAF) sobre os desfechos metabólicos das mães, esses efeitos aparentemente não representaram um impacto tão significativo sobre a

prole em relação à maioria dos parâmetros avaliados em longo prazo, indicando que as condições do ambiente intrauterino e/ou do ambiente neonatal não são determinantes exclusivos para o desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica na prole, pelo menos neste modelo animal. Deste modo, fica nítida a relevância do tempo e do período da reprodução ao qual a dieta de cafeteria é administrada como condição essencial para estabelecer alterações de longo prazo sobre a prole, ou seja, a magnitude do impacto produzido sobre a prole é, em alguns aspectos, proporcional ao tempo que a mãe ingeriu esta dieta. De um modo geral, podemos dizer que os efeitos observados até aqui na prole das ratas do grupo PAD/CAF não são de caráter estável, embora estas ninhadas tenham apresentado um alto peso ao nascimento, de modo semelhante à prole do grupo CAF/CAF.

Neste ponto, propomos que, em adição às alterações no ambiente intrauterino e/ou no ambiente neonatal, há outra origem epigenética possivelmente responsável pelas alterações de longo prazo observadas na prole do grupo CAF/CAF. Em trabalho realizado por Ng e colaboradores (2010), a administração crônica de dieta hiperlipídica em ratos machos repercutiu em alterações nas células  $\beta$ -pancreáticas em suas descendentes (fêmeas adultas, alimentadas com ração padrão) e consequente alteração na secreção de insulina frente ao teste de tolerância à glicose. Ao buscarem as bases moleculares desses fenômenos, os autores encontraram modificações na expressão de 77 genes envolvidos na morfologia e na função pancreática nestas fêmeas, assinalando modificações epigenéticas transmitidas pelos gametas dos pais alimentados com HFD. Estas mudanças epigenéticas desempenham um importante papel na função celular, fazendo com que estas células apresentem características estáveis diferentes apesar de conterem o mesmo material genômico.



Embora no presente estudo tenha sido adotado um modelo experimental diferente, pode-se sugerir que os descendentes das mães do grupo CAF/CAF teriam herdado uma “suscetibilidade” ao desenvolvimento de obesidade e síndrome metabólica, a qual foi fortemente favorecida frente às condições ambientais, tais como o aumento do cuidado materno acrescido da oferta de leite rico em gordura e carboidratos. De fato, os descendentes das ratas do grupo CAF/CAF apresentaram aumento no conteúdo de gordura abdominal, nas concentrações plasmáticas de insulina, de leptina e de triglicérides quando adultos, embora tenham consumido apenas ração padrão após o desmame.

Com os resultados do presente trabalho, devemos considerar a relevância tanto de um estado metabólico materno prévio à concepção quanto de modificações metabólicas induzidas pela dieta a partir da gestação (modificando, por seu turno, o ambiente intrauterino e neonatal) sobre o desenvolvimento da prole. Ao que nossos resultados indicam, a soma destes fatores exerce um maior impacto sobre os desfechos avaliados na prole, conforme observado no grupo CAF/CAF. Ainda, ao compararmos os efeitos nos grupos PAD/CAF e CAF/PAD, podemos dizer que a administração da dieta de cafeteria durante a gestação exerce um impacto mais considerável em curto prazo. A ausência de modificações endócrinas e metabólicas observadas na prole do grupo CAF/PAD pode nos indicar que a interrupção no consumo da dieta de cafeteria a partir da concepção é uma abordagem passível de prevenir o desencadeamento das alterações sobre a prole, muito embora a mãe possa estar apresentando um quadro de sobrepeso e/ou obesidade no momento da concepção. Contudo, não sabemos se a exposição da prole destas ratas a este modelo de dieta, após o desmame, não poderia desencadear uma resposta endócrina e metabólica exacerbada em comparação aos descendentes do grupo

controle. De qualquer forma, neste caso, podemos sugerir que a não exposição da prole a fatores ambientais obesogênicos após a concepção é importante ao favorecer um desenvolvimento saudável nestes animais, ao menos no que se refere ao desenvolvimento de obesidade e resistência à insulina.

Com os resultados do presente estudo, não conseguimos distinguir claramente as influências do ambiente intrauterino *versus* as influências do ambiente neonatal sobre o desenvolvimento da prole. É importante observarmos que a administração da dieta de cafeteria no período de prenhez + lactação está associada às alterações de comportamento maternal; porém, não podemos estabelecer uma relação causal entre as modificações no comportamento materno e as alterações no desenvolvimento da prole. Uma ferramenta apropriada para melhor diferenciarmos os fatores maternos dos fatores ambientais sobre o desenvolvimento da prole seria o modelo de *cross-fostering* (de Souza *et al.*, 2012), caracterizado pela remoção dos filhotes dos seus progenitores biológicos, passando a ser criados por substitutos. Desta forma, podem-se avaliar os diferentes impactos de origem genética, epigenética, ou ambiental. Outra proposta viável seria a inclusão de pelo menos mais dois grupos experimentais: um que recebesse dieta de cafeteria somente durante a prenhez, e outro que a recebesse somente durante a lactação.

Em continuidade à análise dos resultados obtidos nos descendentes das ratas do grupo CAF/CAF, observou-se um aumento no conteúdo de gordura abdominal, embora este achado não tenha sido acompanhado por elevação no peso corporal ao ser comparado aos demais grupos. Ao avaliarmos a ingestão alimentar da prole, não foi observado aumento no consumo de ração padrão do desmame até a idade adulta nos diferentes grupos, que pudesse justificar o aumento de gordura abdominal observado nestes animais. De forma semelhante aos nossos achados,

Howie e colaboradores (2009) também observaram que os descendentes (adultos) de mães obesas não exibiram alterações no consumo de ração padrão, apresentando aumento no consumo alimentar apenas quando eram expostos a alimentos hiperpalatáveis, comparando-se à prole de mães não obesas.

Ao verificar-se que não há um padrão hiperfágico nestes animais, consideramos a possibilidade de um desequilíbrio no balanço energético, o qual apresentaria uma menor eficiência no gasto energético e conseqüente acúmulo de gordura abdominal. Neste aspecto, inferimos a hipótese da “programação metabólica”, processo pelo qual fatores atuantes nos estágios iniciais da vida produzem adaptações fisiológicas de caráter estável (Armitage *et al.*, 2004), podendo ser desencadeada pela exposição fetal e neonatal a um ambiente rico em gorduras e carboidratos (Parsons *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008). De fato, há evidências convincentes de que, em várias espécies de mamíferos, um fenótipo obeso ou com sobrepeso durante a gestação e lactação está associado a alterações nas funções metabólicas, endócrinas e homeostáticas da prole (Barker *et al.*, 2002; Ehernberg *et al.*, 2002; Samuelsson *et al.*, 2008), incluindo hiperinsulinemia e hiperleptinemia, independentemente da dieta recebida no período pós-natal (Howie *et al.*, 2009). Sem dúvida, os resultados obtidos no presente estudo reproduzem de forma bastante aproximada os achados dos estudos citados anteriormente. Todavia, os mecanismos mediadores da “programação” da obesidade e da síndrome metabólica ainda são pouco conhecidos. Diferentes autores têm examinado a participação da leptina na sinalização do eixo hipotalâmico-hipofisário-tireoideo (HHT) em ratos sobrenutridos durante o período de lactação. Os hormônios tireoideanos estimulam o gasto energético através da termogênese, e sabe-se que a leptina apresenta um papel estimulador da função tireoideana, principalmente por

aumentar a expressão de TRH (hormônio liberador de tireotrofina) no hipotálamo (Rodrigues *et al.*, 2009), por exercer ação direta sobre a hipófise liberando TSH (hormônio tireoestimulante) (Jin *et al.*, 2000; Sone *et al.*, 2001), ou ainda indiretamente via ações no núcleo arqueado (ARQ) do hipotálamo (Martin *et al.*, 2006), porém, as ações diretas sobre a tireóide ainda são controversas (de Oliveira *et al.*, 2007). Distúrbios na função da tireoide frequentemente resultam em importantes mudanças no gasto energético, e podem ter como consequência o aumento do peso corporal (Rodrigues *et al.*, 2009). Embora não tenha sido avaliada a função tireoideana, além do aumento da leptina plasmática observada nos descendentes do grupo CAF/CAF, poderíamos considerar a possibilidade da instalação de uma resistência central à leptina, justificando uma reduzida sinalização do *status* metabólico deste organismo e, conseqüentemente, um menor estímulo ao gasto energético. Em suporte aos achados do presente estudo, Férezou-Viala e colaboradores (2007) demonstraram que machos descendentes de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica no período perigestacional apresentaram resistência hipotalâmica à leptina sem aumento significativo no peso corporal, independentemente da dieta recebida após o desmame.

Embora os descendentes do grupo CAF/CAF não estejam obesos fenotipicamente, a deposição aumentada de gordura abdominal parece ser o fator-chave responsável pelas diversas alterações observadas na idade adulta, como o aumento na concentração de leptina e de insulina plasmáticas. Os níveis de leptina estão diretamente relacionados ao conteúdo de tecido adiposo (Levin *et al.*, 2004), e os níveis de insulina evidenciam a forte relação existente entre o aumento do tecido adiposo e o desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (Sims *et al.*, 1973; Freidenberg *et al.*, 1988; Garcia-Diaz *et al.*, 2011). Isso foi demonstrado, no presente

trabalho, através dos testes de correlação, os quais mostraram uma forte correlação positiva entre tecido adiposo e níveis plasmáticos de insulina. Este aumento de insulina plasmática poderia estar indicando uma redução na sensibilidade à insulina, uma vez que uma hiperinsulinemia compensatória se apresenta, na maioria das situações, de modo prévio à resistência insulínica (Carvalho-Filho *et al.*, 2007).

É interessante observar que não houve alteração nas concentrações de ang II na prole do grupo CAF/CAF, não havendo correlação significativa com o aumento de gordura abdominal. Este resultado contrapõe não só os estudos que associam o aumento do conteúdo plasmático dos componentes do SRA ao aumento do tecido adiposo (Licata *et al.*, 1994; Unemura *et al.*, 1997; Goodfreind *et al.*, 1999; Engeli *et al.*, 2005), como também os dados que encontrados nas mães, no presente estudo. É importante observar que a prole do grupo CAF/CAF não está fenotipicamente obesa, pois não apresenta aumento de peso corporal, a despeito de um maior depósito de gordura abdominal. O estudo de Engeli e colaboradores (2000) demonstrou que o angiotensinogênio derivado do tecido adiposo corresponde a menos de 20% da sua concentração plasmática. Desta forma, é possível que a ampla expressão do SRA comumente observada em indivíduos obesos seja dependente de uma maior quantidade de tecido adiposo. Neste sentido, as alterações observadas na prole do grupo CAF/CAF não estariam associadas a distúrbios no SRA.

O teste de comportamento sexual foi realizado na prole com o objetivo de investigar os efeitos das alterações metabólicas sobre parâmetros reprodutivos em machos e, ainda, se o comprometimento da função reprodutiva estaria relacionado a modificações precoces como as variações no ambiente intrauterino decorrentes do consumo alimentar materno. Sabe-se que a integridade do eixo hipofisário-

hipotalâmico-gonadal (HHG) é crucial na função do sistema reprodutivo e também no comportamento sexual (Naftolin, 1981; Nelson, 1995). De fato, as proles dos grupos CAF/CAF, PAD/CAF e CAF/PAD apresentaram modificações no comportamento sexual, como aumento na latência de intromissão e redução nas frequências de intromissão. Estes achados foram acompanhados por reduções significativas nas concentrações plasmáticas de testosterona e FSH, quando comparados ao grupo PAD/PAD. Curiosamente, as modificações comportamentais e hormonais foram instauradas com a mesma magnitude, não havendo diferenças significativas entre CAF/CAF, PAD/CAF e CAF/PAD, embora tenhamos observado aumento de gordura abdominal, de insulina e leptina plasmáticas somente no grupo CAF/CAF. Portanto, neste caso, não podemos atribuir as alterações endócrinas e metabólicas associadas ao aumento da adiposidade como fator determinante exclusivo dos distúrbios de fertilidade, conforme descrito em diferentes trabalhos (Landry *et al.*, 2012; Palmer *et al.*, 2012; Michalakis *et al.*, 2013). A redução da testosterona na prole dos diferentes grupos pode indicar que o estado metabólico da mãe tanto na concepção quanto durante o desenvolvimento fetal pode influenciar o desenvolvimento gonadal e/ou a esteroidogênese. No entanto, a redução da testosterona foi acompanhada por uma redução do FSH. Não havendo o clássico mecanismo de *feedback* negativo característico deste sistema de regulação hormonal (Ganong, 1993), este resultado sugere um possível defeito central na regulação do eixo reprodutivo. Uma hipótese que potencialmente explicaria um mecanismo para este fenômeno seria a ação da insulina materna, possivelmente aumentada tanto durante os primeiros estágios embrionários (grupo CAF/PAD) como em estágios mais avançados do desenvolvimento fetal (grupo PAD/CAF). Este aumento poderia produzir uma *downregulation* de receptores centrais para

insulina, especificamente nos neurônios GnRH dos embriões/fetos. O desenvolvimento de uma cultura de células hipotalâmicas serviu de ferramenta para observar que neurônios que expressam GnRH também expressam receptores para insulina, e que a insulina induz a rápida estimulação da expressão de GnRH por estimulação dos genes c-fos e EGR-1 (Salvi *et al.*, 2006). Camundongos com 95% de deleção dos receptores centrais para insulina apresentam, entre outros efeitos, distúrbios de fertilidade devido à redução da secreção de LH (Brunnering *et al.*, 2000). Para testar a integridade da funcionalidade hipofisária destes animais, Brunnering e colaboradores (2000) aplicaram injeção intraperitoneal de Lupron (agonista do receptor GnRH), e foi observado aumento da secreção de LH. Este dado aponta a importância da integridade dos receptores centrais de insulina para a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal.

Embora a PRL participe do processo reprodutivo em machos (Freeman, 2000; Kokay *et al.*, 2011), a concentração plasmática de PRL não foi modificada entre os grupos, indicando que a dieta materna parece não interferir na síntese e liberação deste hormônio, ou ainda, que a dieta materna não influencia a maturação dos lactotrofos e dos sistemas de regulação se secreção de PRL, diferentemente do que parece ocorrer em outras áreas encefálicas envolvidas no controle da reprodução, conforme discutido. Desta forma, as modificações reprodutivas observadas neste modelo experimental não estabelecem relação com modificações na regulação da PRL.

Embora não tenhamos conseguido determinar com precisão a origem destas alterações, este conjunto de resultados demonstra que o consumo materno de dieta de cafeteria pode afetar a secreção dos hormônios reprodutivos da prole independentemente do tempo de administração e do período da reprodução ao qual

a mãe foi exposta à dieta, podendo indicar que a regulação e o desenvolvimento do eixo endócrino reprodutivo é consideravelmente mais sensível aos efeitos da dieta materna em comparação a outros sistemas fisiológicos, como por exemplo, o sistema de regulação do balanço energético. Ainda, devemos considerar que durante a embriogênese, o SNC é um dos primeiros sistemas a ser formado, e é extremamente dependente das condições do meio (Moore, 2008).

O conjunto de dados deste estudo pode indicar a importância de uma boa saúde nutricional e da boa qualidade dos alimentos ingeridos por mulheres em idade reprodutiva, especialmente no período perigestacional, um momento crítico durante o qual a exposição do embrião e/ou feto a um ambiente intrauterino inadequado pode contribuir para um risco aumentado de obesidade nestes indivíduos, comprometendo a sua qualidade de vida. Acredita-se que, de algum modo, esse advento também pode representar uma forma de ameaça à espécie a partir do momento em que observamos importantes alterações no eixo reprodutivo desta prole. Assim, cabe lembrar que existe um círculo vicioso na obesidade que envolve geração após geração, contribuindo para a epidemia mundial desta patologia e dos seus distúrbios associados.

Tendo evidenciado a relação existente entre a obesidade materna e as alterações observadas na prole, e considerando os efeitos adipogênicos da ang II (Licata *et al.*, 1994; Unemura *et al.*, 1997; Goodfreind *et al.*, 1999; Engeli *et al.*, 2005), avaliou-se uma possível participação deste peptídeo na modulação desses fenômenos, por meio do bloqueio farmacológico dos receptores do tipo AT1, com o acréscimo do fármaco Losartan na água de beber das mães, administrado simultaneamente ao consumo de dieta de cafeteria.



Desde modo, foi demonstrado que o bloqueio do receptor do tipo AT1 para ang II, nas ratas, preveniu o desenvolvimento de obesidade e de suas desordens metabólicas relacionadas. Além disso, a prole das ratas que receberam Losartan foi beneficiada quanto aos desfechos metabólicos, endócrinos e reprodutivos. Esses resultados podem contribuir para o entendimento dos mecanismos associados à obesidade e ao desenvolvimento de abordagens farmacológicas para o seu tratamento.

É bem estabelecido o papel-chave da ang II na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e, conseqüentemente, sobre a regulação da pressão arterial. Desta forma, inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA) e bloqueadores dos receptores AT1 são amplamente utilizados para o tratamento da hipertensão, incluindo a hipertensão associada à obesidade. Tendo sido observada uma superexpressão do SRA em indivíduos obesos, foi sugerido que os componentes do SRA poderiam indicar o elo que há entre a obesidade e as modificações a ela associadas, como a hipertensão, a resistência à insulina e outras alterações metabólicas (Kalupahana, 2012). Além disso, a expressão dos receptores AT1 está aumentada em ratos obesos adultos (Pinterova *et al.*, 2001). Visto que os componentes do SRA apresentam uma correlação positiva com o índice de massa corporal em humanos (Goossens *et al.*, 2003), foi proposto que a redução da atividade do SRA poderia não só tratar a hipertensão relacionada à obesidade, como também tratar a obesidade *per se* (Velkoska *et al.*, 2009). Em suporte a esta proposta, foi demonstrado que o uso de inibidores da ECA para o tratamento da hipertensão apresentou efeito de perda de peso em humanos (Hipertension Study Group Investigators, 1984) e em ratos (Setoguchi *et al.*, 2002), e o bloqueio dos receptores AT1 tem causado redução da resistência à insulina em ratos (Shiuchi *et*

*al.*, 2004; Aksnes *et al.*, 2006). Em estudo recentemente realizado em nosso laboratório, Sagae e colaboradores (2013) observaram que a injeção intraperitoneal de bloqueador de receptores AT1, Losartan, preveniu a instalação de obesidade em ratas submetidas à dieta de cafeteria.

Ao avaliarmos o ganho de peso corporal no período pré-gestacional, o grupo CAF + LOS apresentou uma diminuição no ritmo de ganho de peso corporal a partir da oitava semana, comparando-se ao seu controle correspondente (grupo CAF), não havendo diferença significativa em relação ao grupo PAD ao final da décima semana de administração da dieta de cafeteria. Este dado indica que o bloqueio dos receptores AT1 produziu uma proteção ao ganho de peso produzido pela dieta. Porém, o grupo CAF+LOS ainda apresentou aumento de peso corporal quando comparado ao grupo PAD+LOS, de modo semelhante ao observado entre os grupos PAD e CAF. No entanto, é importante observarmos que a administração de Losartan no grupo controle (PAD+ LOS) não produziu diferenças em relação ao grupo controle, PAD.

Ao avaliarmos o comportamento sexual através da relação número de lordoses/ número de montas, observamos que o mesmo não foi afetado nem pela obesidade, nem pela administração de Losartan, conforme já evidenciado em estudo prévio (Sagae, 2013). O efeito da ang II sobre o comportamento sexual ainda é controverso. Em condições fisiológicas, o bloqueio de receptores AT1 e AT2 na amígdala medial não altera o comportamento sexual de ratas. Porém, em situações de estresse agudo, os efeitos inibitórios do estresse sobre o comportamento sexual foram prevenidos pelo bloqueio de ambos os subtipos de receptores para ang II na amígdala medial (Cecconello *et al.*, 2010), enquanto a administração periférica de Losartan não altera esses efeitos (Donadio *et al.*, 2007). Na hipertensão, o Losartan

não altera a função sexual em ratos machos (Ferrario & Levy, 2002), e melhora a função sexual em homens (Chan *et al.*, 1999). Estes diferentes estudos indicam que o efeito da ang II sobre o comportamento sexual é influenciado por diversos fatores como sexo, espécie, metodologia de estudo e condições fisiológicas. Ao que nossos resultados indicam, a associação de Losartan com dieta de cafeteria não produz efeitos sobre o comportamento sexual em ratas.

Durante a gestação, o ganho de peso corporal do grupo PAD/CAF + LOS apresentou o maior percentual de ganho de peso neste período porém, um ganho inferior ao seu controle PAD/CAF. Ao final de 21 dias de gestação, no entanto, foi demonstrado que o tratamento com Losartan preveniu o ganho de peso nas ratas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS, quando comparadas aos seus controles correspondentes.

Assim como observado na obesidade, o tratamento com Losartan também não interferiu no número de concepções. Estudos inicialmente realizados na década de 80 (quando o uso de bloqueadores dos receptores de ang II ou de inibidores da ECA tiveram seu uso aprovado para o tratamento da hipertensão) demonstraram efeitos teratogênicos, retardo do crescimento fetal, falência renal, hipotensão neonatal, hipoplasia pulmonar, entre outros defeitos, culminando em elevados níveis de mortalidade fetal e neonatal (Guinard *et al.*, 1981; Duminy & Burguer, 1981; Beckman & Brent, 1990; Barr & Cohen, 1991; Martin *et al.*, 1992; Polikfa, 2012), o que tornou o uso destes fármacos contraindicado durante a gestação. No presente estudo, no entanto, não foram observados efeitos que pudessem repercutir em mortalidade da prole das ratas tratadas com Losartan, tanto no período neonatal quanto no período subsequente.

O peso médio das ninhadas nos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS mostrou-se significativamente aumentado no primeiro dia pós-natal (DPN 1) comparando-se aos grupos PAD/PAD + LOS e CAF/PAD + LOS, e sem diferenças dos seus controles correspondentes (CAF/CAF e PAD/CAF). Esse achado obedece à lógica da “hipótese da sobrenutrição fetal”, discutida anteriormente, que associa o alto peso ao nascimento ao aumento da oferta de nutrientes no ambiente intrauterino (Nivoit *et al.*,2009). Entretanto, no décimo dia pós-natal (DPN10) já não foram observadas diferenças entre o peso médio das ninhadas nos diferentes grupos tratados com Losartan. Ainda, as ninhadas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS apresentaram redução significativa de peso quando comparadas aos seus controles (CAF/CAF e PAD/CAF). É interessante salientar que, durante o período de 10 dias em que foi registrado o comportamento maternal, foi observado que as ratas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS exibiram uma redução das frequências de amamentação, quando comparadas aos seus controles (CAF/CAF e PAD/CAF), apresentando-se semelhante aos grupos PAD/PAD e CAF/PAD (com ou sem a administração de Losartan). Deste modo, a administração de Losartan preveniu o aumento do comportamento de amamentação produzido pelo consumo da dieta de cafeteria.

Tendo observado redução da frequência de amamentação somente nas ratas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS em associação ao menor conteúdo de gordura abdominal, promovido pelo fármaco (discutido a seguir), remetemos às hipóteses levantadas anteriormente, de que pode haver uma via de sinalização alternativa, oriunda do tecido adiposo, que estimula o cuidado maternal na obesidade. Essa hipótese colocaria em segundo plano a possibilidade de o aumento da lactação ser decorrente do aumento da procura pelos filhotes devido à

maior palatabilidade do leite materno, conforme sugerido. Além disso, nos grupos tratados com Losartan, o consumo materno de alimentos altamente palatáveis ainda está presente e parece não ser um fator decisivo no sentido de aumentar a procura dos filhotes pelo leite materno.

Outro ponto que chama a atenção é que a administração de Losartan diminuiu o comportamento de lambida e a concentração de PRL em todos os grupos. Sabe-se que o comportamento de lambida é um comportamento motivado e dependente da ação da PRL na APOM e vBST (Stern, 1997; Numan, 2006), de modo que a infusão intracerebroventricular deste hormônio próximo à APOM estimula marcadamente o cuidado maternal de filhotes adotivos (Walsh *et al.*, 1987). A APOM é sensível ao estímulo da ang II (Sirett *et al.*, 1977) e, desta forma, o bloqueio dos seus receptores poderia também interferir diretamente na responsividade maternal. Além disso, a redução da concentração de PRL pode ser um dos marcadores do efeito central do fármaco, pois nota-se o bloqueio do efeito estimulatório da ang II sobre os lactotrofos.

De qualquer forma, pode-se estabelecer importantes observações sobre a relevância das influências do ambiente neonatal (neste caso, o aumento da oferta de alimento) quando associada aos fatores do ambiente intrauterino na determinação do ganho de peso na prole. Este aspecto merece atenção, pois, conforme discutido adiante, a normalização do padrão de amamentação repercutiu na ausência de diferença de peso corporal das proles no momento do desmame.

Após o desmame dos filhotes, foi observado que a redução no ganho de peso corporal observada nas ratas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS foi resultante de uma redução do acúmulo de gordura abdominal, quando comparados aos seus controles (CAF/CAF e PAD/CAF). Além disso, as mães dos

grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS exibiram uma redução do conteúdo de insulina, leptina e triglicérides plasmáticos quando comparados aos seus controles correspondentes (CAF/CAF e PAD/CAF), de modo que se tornaram semelhantes aos grupos que não consumiram dieta de cafeteria. Em associação a esses resultados, observamos que todos os grupos tratados com Losartan exibiram um aumento significativo da ang II circulante, não havendo diferença entre os grupos, o que demonstra a efetividade do modelo de bloqueio farmacológico aplicado neste estudo, indicando o aumento da ang II plasmática como uma resposta compensatória ao bloqueio dos receptores AT1 (Christen *et al.*, 1991; Pals, 1993).

Os resultados do presente experimento reproduzem de modo muito aproximado os relatos de estudos prévios, que demonstram que o bloqueio do receptor AT1 resulta em diminuição do peso do tecido adiposo e o tamanho dos adipócitos em ratos (Zorad *et al.*, 2006) e em camundongos diabéticos (Tomono *et al.*, 2008). Considerando que a hipertrofia do tecido adiposo e consequente ativação do SRA estão relacionadas ao desenvolvimento de resistência à insulina e DM2 (Henriksen, 2007; Olivares-Reyes *et al.*, 2009), o estudo clínico de Gillespie e colaboradores (2005) demonstrou que o bloqueio dos receptores AT1, ou o uso de inibidores da ECA, reduziu em 22% a incidência de novos casos de DM2 em pacientes considerados de alto risco. Mais recentemente, McMurray e colaboradores (2010) observaram que o uso do bloqueador do receptor AT1, Valsartan, em associação a modificações no estilo de vida foi capaz de reduzir a incidência de DM2 em 14% em indivíduos com intolerância à glicose. Um efeito semelhante também é observado em ratos com deleção de receptores AT1, os quais apresentam proteção aos efeitos da obesidade induzida por dieta tanto em relação ao ganho de peso

quanto ao desenvolvimento de resistência à insulina, observados na obesidade (Koyuama *et al.*, 2005).

As interações entre a ang II e a resistência insulínica parecem ocorrer em nível intracelular: a ativação do SRA está associada à redução da sinalização da insulina e resistência insulínica em tecidos como o músculo esquelético e o fígado (Fukuda *et al.*, 2001; Kurtz & Pravenec, 2004), bem como em outros tecidos sensíveis à insulina como o tecido cardíaco, o vascular e o renal (Lastra *et al.*, 2006). A ang II reduz a fosforilação de tirosina estimulada por insulina (Velloso *et al.*, 1996), enquanto aumenta a fosforilação de serina no substrato do receptor de insulina (IRA-1) e da fosfatidilinositol-3-quinase, reduzindo a sinalização pelo receptor de insulina (Sykiotis & Papavassiliou, 2001). Tanto a redução da fosforilação em tirosina quanto o aumento da fosforilação em serina do receptor de insulina e do IRS-1, foram propostos como mecanismos moleculares de resistência à insulina (Tanti *et al.*, 1994; Mothe & Van Obberghen 1996; Sykiotis & Papavassiliou, 2001). Além disso, a administração de antagonista de receptor AT1 aumenta a translocação de GLUT-4 para a superfície celular (Hoenack & Roesen 1996), evitando o acúmulo de lipídeos em tecidos como o músculo esquelético, fígado e pâncreas (Janke *et al.*, 2002), retardando ou evitando o início do diabetes através da redução da intolerância à glicose (Sharma *et al.*, 2002; Kjeldsen *et al.*, 2006). Outro efeito do bloqueio do SRA na prevenção do DM2 tem sido explicado pelo aumento da sensibilidade à insulina e da secreção de insulina pelas células  $\beta$ -pancreáticas, embora os mecanismos ainda não estejam completamente claros (Henriksen, 2007; Leung, 2007). Em conjunto, esses dados sugerem um papel da ang II na adipogênese, e também como uma das substâncias produzidas pelo tecido adiposo hipertrófico, que podem modular de forma negativa a sensibilidade à insulina, podendo ser um possível elo entre

obesidade, resistência à insulina, DM2 e hipertensão arterial, que frequentemente apresentam-se associados em indivíduos obesos (Carvalho-Filho *et al.*, 2007).

O fármaco utilizado neste experimento, Losartan, é um bloqueador seletivo dos receptores do tipo AT1. No entanto, o tecido adiposo de roedores apresenta os dois tipos de receptores, AT1 e AT2 (Giacchetti *et al.*, 2002), e o receptor AT2 apresenta efeitos antagônicos ao receptor AT1: induz vasodilatação e inibe o crescimento e proliferação celular (Hayashida *et al.*, 1996; Siragy, 2000; Matsubara, 2002). Embora a afinidade da ang II pelo receptor AT2 seja menor (Hayashida *et al.*, 1996), é possível que parte da ampla disponibilidade de ang II no plasma destes animais tenha permitido a sua ligação aos receptores AT2 nos adipócitos, podendo também justificar o menor conteúdo de gordura observado nos animais dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS.

A redução nas concentrações de triglicérides nas ratas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS também é atribuída à redução da deposição de gordura, devendo-se também considerar que a insulina tem ações pleiotrópicas, modulando diversas funções celulares. Além do seu papel sobre a homeostase da glicose, este hormônio atua no metabolismo de lipídeos e proteínas (Saltiel & Khan, 2001) e, neste caso, ao aumentar a sensibilidade à insulina, é possível que o metabolismo lipídico também tenha sido favorecido.

No presente experimento, também evidenciamos uma redução nas concentrações plasmáticas de leptina nas ratas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS, quando comparadas aos seus controles. Sabe-se que a leptina é um hormônio secretado pelo tecido adiposo, atuando na sinalização hipotalâmica sobre a disponibilidade energética em longo prazo, de modo que sua concentração plasmática é diretamente proporcional ao conteúdo de gordura corporal (Levin,



2004), representando, desta forma, a redução da leptina circulante um reflexo da redução da adiposidade. Além disso, sabe-se que tanto a ang II sintetizada nos próprios adipócitos quanto a sua administração exógena estimula a produção e secreção de leptina pelos adipócitos (Cassis *et al.*, 1998), e deste modo, o bloqueio dos receptores AT1 justifica a queda nas concentrações de leptina.

Apesar de todas essas evidências, os mecanismos de ação que associam o bloqueio de receptores AT1 aos efeitos metabólicos observados ainda precisam ser esclarecidos, bem como o seu significado fisiológico. Sabe-se que a ang II intracerebroventricular induz redução de peso e de consumo alimentar em ratos (Porter & Potratz, 2004), embora os efeitos da ang II periférica sobre estes aspectos sejam controversos. O trabalho de Sagae e colaboradores (2013) demonstrou que a injeção intraperitoneal de Losartan promoveu aumento na quantidade de alimento e de calorias consumidas pelos animais alimentados com dieta de cafeteria, entretanto, houve uma redução na deposição de gordura corporal nestes animais em comparação ao grupo tratado com veículo. Uma possível explicação é que o fármaco, ao atravessar a barreira hematoencefálica (Polidori *et al.*, 1996), é capaz de inibir as ações centrais da ang II, porém, ao inibi-la periféricamente, pode-se contribuir para a redução da deposição de gordura, conforme demonstrado no presente trabalho e em outros (Zorad *et al.*, 2006; Tomono *et al.*, 2008).

O efeito do bloqueio dos receptores AT1 na prevenção do desenvolvimento da obesidade materna também refletiu positivamente sobre os desfechos avaliados na prole.

No momento do desmame (21 dias de vida), os filhotes das ratas dos grupos CAF/CAF + LOS e PAD/CAF + LOS apresentaram redução do peso corporal em comparação aos filhotes dos grupos CAF/CAF e PAD/CAF. Além disso, não

houve diferença de peso corporal entre os filhotes das mães tratadas com Losartan. Quando adultos, também não foram observadas diferenças de peso corporal e de consumo de ração padrão. O conteúdo de gordura abdominal também foi reduzido na prole das ratas tratadas com CAF + LOS, não tendo sido observadas diferenças entre os grupos tratados. Esses achados indicam que, ao bloquear, com Losartan, os efeitos da dieta de cafeteria na mãe durante a prenhez e lactação e melhorando suas condições fisiológicas, também é possível prevenir o efeito de ganho de peso na prole. Somando-se a isso, reforçamos os achados que apontam a redução do comportamento de amamentação exibido pelas mães tratadas com Losartan, o que poderia indicar que há uma importante influência ambiental envolvida no desenvolvimento da obesidade infanto-juvenil e que frequentemente se estende até a idade adulta (Parsons *et al.*, 2001; Simmons, 2008; Nivoit *et al.*, 2009).

Conforme discutido anteriormente, o efeito mais pronunciado da obesidade materna sobre a prole foi observado no grupo CAF/CAF. Com o bloqueio farmacológico realizado nas mães, a prole das ratas do grupo CAF/CAF + LOS apresentou, como consequência à redução do conteúdo de gordura abdominal, quando adulta, uma melhora do estado fisiológico geral, demonstrado através das reduções do conteúdo lipídico, da normalização do conteúdo plasmático de insulina e de leptina. Estes achados sugerem mais uma vez que, embora não estivessem fenotipicamente obesos, o aumento de gordura abdominal observado na prole das ratas CAF/CAF exerce um importante impacto sobre os aspectos endócrinos e metabólicos (Chan *et al.*, 1994; Mayes & Watson, 2004; Garcia-Diaz *et al.*, 2011).

Um ponto importante é que a administração de Losartan nas mães repercutiu em uma redução dos níveis basais de ang II da prole, em todos os grupos. É sabido que o uso de bloqueadores de receptores para ang II ou de

inibidores da ECA exercem um importante efeito nocivo sobre o desenvolvimento renal do feto (Quan, 2006; Polikfa, 2012). Considerando-se que roedores apresentam rins e trato urinário imaturos ao nascimento (a nefrogênese estende-se até meados do 18º dia pós-natal), estudos em animais têm demonstrado que a ang II induz o crescimento celular via AT1, sendo essencial para o desenvolvimento renal do feto (Lasaitiene *et al.*, 2006; Sekine *et al.*, 2009). Deste modo, é sugerido que o efeito do bloqueio farmacológico de receptores AT1 estendeu-se também aos fetos, prejudicando o desenvolvimento renal, incluindo o aparelho justaglomerular, e desta forma, reduzindo a produção de renina. Outra possibilidade é que, com o bloqueio dos receptores AT1, o aumento de ang II materna possa ter estimulado demasiadamente os receptores AT2 nos rins dos fetos, que são amplamente expressos durante este período, e que têm propriedades apoptóticas (Lasaitiene *et al.*, 2006). Assim, o desenvolvimento renal do feto também poderia ter sido prejudicado, repercutindo em uma menor capacidade de produção de renina devido a modificações nas células justaglomerulares e conseqüentemente em menores concentrações de ang II basal. Portanto, este ponto requer atenção, e mais estudos são necessários para que sejam investigados possíveis efeitos indesejáveis decorrentes da administração deste fármaco ou de outros inibidores do SRA durante a gestação em roedores submetidos a protocolos experimentais, sendo que tais investigações deveriam abranger os diferentes sistemas fisiológicos e suas peculiaridades. Ainda, sugere-se testar diferentes doses e diferentes tempos de administração, visto que os estudos anteriormente citados sobre os efeitos nocivos do bloqueio de AT1 sobre o desenvolvimento fetal não nos fornecem tais informações (Guinard *et al.*, 1981; Duminy & Burguer, 1981; Beckman & Brent, 1990; Barr & Cohen, 1991; Martin *et al.*, 1992; Polikfa, 2012).

No presente estudo, foi observado também que a administração de Losartan nas mães repercutiu em aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona e consequente redução de FSH, em todos os grupos, determinando uma clara regulação destes dois hormônios por meio de um mecanismo de *feedback* negativo (Ganong, 1993), normalizando, por fim os padrões de secreção hormonal que se apresentaram modificados nos grupos que não receberam Losartan. Somado a isso, houve modificações no comportamento sexual em todos os grupos, sendo evidenciado por meio dos diferentes parâmetros analisados: houve redução nas latências de monta, redução nas frequências de monta até a primeira intromissão, redução das latências de intromissão e aumento das frequências de intromissão. Deste modo, a prole dos grupos PAD/CAF + LOS, CAF/CAF + LOS e CAF/PAD +LOS apresentou um padrão de comportamento sexual semelhante ao grupo controle PAD/PAD. Importante observarmos que o tratamento das mães com Losartan também repercutiu em modificações no comportamento sexual do grupo PAD/PAD +LOS, de modo que houve redução da latência de monta e da latência de intromissão em comparação ao grupo não tratado (PAD/PAD).

Ao considerar a hipótese de que as melhorias das condições fisiológicas da mãe repercutiram em melhora no desenvolvimento da prole, pode-se reassumir o papel da insulina materna no desenvolvimento do eixo reprodutivo da prole, conforme discutido anteriormente. A partir do momento em que o bloqueio de AT1 impede a instalação da obesidade e da consequente elevação de insulina nas mães, vê-se anulado o possível efeito deletério das altas concentrações deste hormônio, durante a gestação, sobre a regulação central dos hormônios reprodutivos da prole. Esse resultado reforça a noção de que as alterações endócrinas e metabólicas

decorrentes da obesidade nas mães podem de fato produzir modificações estáveis nos diferentes níveis de regulação do processo reprodutivo dos seus descendentes.

No entanto, ao considerar-se que o uso do fármaco também produziu modificações no comportamento sexual da prole do grupo controle (PAD/PAD + LOS), remete-se ao efeito de redução da ang II basal observada na prole de todos os grupos. A imunorreatividade à ang II e a expressão dos seus receptores AT1 e/ou AT2 estão presentes em diversas áreas centrais responsáveis pelo processamento do comportamento sexual, como APOM e AMe (Tsutsumi & Saavedra, 1991). Um estudo prévio realizado em nosso laboratório observou que injeções de ang II na AMe inibe o comportamento sexual de ratos, sendo este efeito prevenido pelo bloqueio dos receptores AT1 ou AT2 (Breigeron *et al.*, 2002), fortalecendo as evidências da participação da ang II na modulação desse circuito neural. Uma possibilidade sugerida a partir dos resultados do presente estudo é de que a redução da ang II basal exerça um efeito facilitador do comportamento sexual em machos. Além disto, estudos *in vitro* demonstram a ação local da ang II, inibindo a capacidade do LH para estimular a produção de testosterona pelas células de Leydig, em ratos adultos (Khanum & Dufau, 1988). Mais uma vez, a redução de ang II basal poderia, neste caso, facilitar a produção de testosterona e, conseqüentemente, estimular o comportamento sexual. Este aumento de testosterona, conforme observado no presente trabalho, estaria exercendo o mecanismo de regulação por *feedback* negativo também sobre o FSH, reduzindo suas concentrações. Ainda, considerando que a testosterona regula os níveis de dopamina na APOM, é possível que o aumento de testosterona tenha produzido aumento de dopamina (Szczyпка *et al.*, 1998) e conseqüente inibição da síntese e liberação de PRL (Freeman, 2000), conforme observado no presente trabalho.

Ainda, é possível também um efeito direto do bloqueio de receptores AT1 sobre a secreção de PRL, de modo que a redução de ang II tenha resultado em uma menor atividade dos lactotrofos, que apresentam receptores para ang II e respondem aos seus efeitos estimulatórios ( Ganong, 1993). Em conjunto, estes dados podem nos indicar uma importante atividade tônica basal da ang II sobre o processo reprodutivo de ratos, de modo que a sua redução basal parece interferir na regulação dos hormônios envolvidos no comportamento sexual.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir, de modo semelhante ao descrito na literatura, que a dieta de cafeteria é um modelo experimental eficiente em promover acúmulo de gordura abdominal, resistência à insulina e outras diversas modificações endócrinas. O aumento da adiposidade materna induzida pela dieta de cafeteria, por sua vez, é um fator predisponente ao desenvolvimento de sobrepeso e obesidade na prole. Em associação, há alterações metabólicas, endócrinas e na função reprodutiva, mesmo que esta prole seja alimentada somente com ração padrão, sugerindo modificações na regulação do balanço energético destes animais.

Além disso, as modificações no ambiente neonatal, caracterizadas por um aumento do cuidado maternal e conseqüente aumento na oferta de alimento também mostra-se um fator contribuinte para o ganho de peso observado nos descendentes de mães alimentadas com dieta de cafeteria. No entanto, os mecanismos envolvidos nestes processos ainda não estão completamente claros, levantando hipóteses sobre vias alternativas que podem contribuir para a modulação do comportamento maternal neste modelo experimental.

O período reprodutivo no qual a fêmea se encontra, no momento em que a dieta de cafeteria é consumida, também parece exercer influência sobre diferentes aspectos observados na prole, de modo que o consumo materno desta dieta durante a gestação tem um efeito negativamente importante não só sobre a saúde materna, como sobre o desenvolvimento da prole. De modo inverso, a suspensão desta dieta a partir do início da gestação é uma medida

passível de reverter um quadro de obesidade prévio à gestação e prevenir seus efeitos prejudiciais sobre a prole. No entanto, foi observado que o consumo materno de dieta de cafeteria, independentemente do período em que foi administrada, produziu importantes modificações na função reprodutiva dos seus descendentes, em associação a modificações nas concentrações de testosterona e FSH. Embora os mecanismos dessas modificações não tenham sido totalmente esclarecidos, os dados do presente trabalho sugerem a hipótese de que a hiperinsulinemia materna possa estar envolvida neste processo, produzindo modificações possivelmente de origem central, na regulação do eixo reprodutivo dos seus descendentes. Porém, não devem ser desconsiderados outros fatores derivados do tecido adiposo, como possíveis mediadores destas disfunções.

O bloqueio farmacológico dos receptores AT1 para ang II, por meio da administração de Losartan, mostrou-se uma abordagem farmacológica eficiente na prevenção da instalação de obesidade nas mães, bem como suas desordens associadas, sem interferir no comportamento sexual e na fertilidade destas ratas. Desta forma, evidencia-se uma importante participação da ang II, através do seu receptor AT1, como um dos fatores mediadores das alterações endócrinas e metabólicas associadas ao acúmulo de gordura corporal, induzidas pela dieta de cafeteria. Ainda, a normalização dos padrões do comportamento maternal nas ratas que receberam Losartan associado à dieta de cafeteria durante a gestação/lactação nos fornece um importante reforço acerca das hipóteses levantadas sobre outros possíveis moduladores do comportamento maternal, possivelmente oriundos do tecido adiposo.



A administração de Losartan, nas mães, também preveniu os efeitos decorrentes do consumo materno de dieta de cafeteria sobre os diferentes desfechos endócrinos, metabólicos e reprodutivos observados na prole. Deste modo, as modificações observadas nos descendentes das ratas que não receberam o fármaco, tiveram seus padrões restabelecidos, embora não tenha ficado clara a participação direta do sistema angiotensinérgico nestes animais.

Em conjunto, os resultados do presente estudo apontam a possibilidade da realização de intervenções farmacológicas para o tratamento da obesidade e também para a prevenção dos efeitos deletérios da obesidade materna sobre o desenvolvimento da prole. No entanto, devem ser considerados os possíveis efeitos indesejados do uso de inibidores ou de bloqueadores do SRA durante a gestação. Deste modo, sugerimos, mais uma vez, uma detalhada investigação acerca do uso destes fármacos durante a gestação e lactação sobre diferentes aspectos fisiológicos da mãe e da prole de ambos os sexos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADA – American Diabetes Association. Diabetes Statistics. Disponível on-line em [http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/?utm\\_source=WWW & utm\\_medium=DropDownDB&utm\\_content=Statistics&utm\\_campaign=COM](http://www.diabetes.org/diabetes-basics/diabetes-statistics/?utm_source=WWW&utm_medium=DropDownDB&utm_content=Statistics&utm_campaign=COM). Acessado em 02/04/2011.

AGMO A. Male rat sexual behavior. *Brain Research Protochols*, 1(2):203-9, 1997.

AHIMA RS, PRABAKARAN D, FLIER JS. Postnatal leptin surge and regulation of circadian rhythm of leptin by feeding. Implications for energy homeostasis and neuroendocrine function. *Journal of Clinical investigation*, 101:1020-1027, 1998.

ALBERTI KGMM, ZIMMET P, SHAW J. Metabolic syndrome – a new worldwide definition. A consensus statement from the International Diabetes Federation. *Diabetic Medicine*, 23:469-80, 2006.

ALLEN AM, ZHUO J, MENDELSON FA. Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *American Journal of Hypertension*, 13:31S-38S 2000.

ANDERSON EJ, LUSTING ME, BOYLE KE, WOODLIEF TL, KANE DA. mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans. *Journal of Clinical Investigation*, 119: 573–58, 2009.

ANKER SD, PONIKOWSKI P, VARNEY S, CHUA TP, CLARK AL, WEBB-PELOE KM, HARRINGTON D, KOX WJ, POOLE-WILSON PA, COATS AJS. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet.*, 349: 1050-1053, 1997.

ARMITAGE JA, JENSEN R, TAYLOR PD, POSTON L. Exposure to a high fat diet during gestation and weaning results in reduced elasticity and endothelial function as well as altered gene expression and fatty acid content of rat aorta. *Journal of Society of Gynecological Investigation.* , 11:183A, 2004.

ARMITAGE JA, TAYLOR PD, POSTON L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy-rich diet during development. *Journal of Ohysiology*, 565: 3-8, 2005.

AKSNES TA, SELJEFLOT I, TORJESEN PA, HÖIEGGEN A, MOAN A, KJELDSEN SE. Improved insulin sensitivity by the angiotensin II-receptor blocker losartan is not explained by adipokines, inflammatory markers, or whole blood viscosity. , 56(11):1470-7, 2007.

BABICHEV VN, SHUSHKINA IV, PERYSHKOVA TA. The effect of neonatal castration of male rats on the level of sex-hormone receptors in the hypothalamus and hypophysis of adult animals. *Biomedical Sciences*, (2):189-92, 1990.

BARKER DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 13:65-74, 2002.

BARKER TA, MASSETT MP, KORSHUNOV VA, MOHAN AM, KENNEDY AJ, BERK BC. Angiotensin II type 2 receptor expression after vascular injury: differing effects of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin receptor blockade. *Hypertension*, 48(5):942-9, 2006.

BARR MJr, COHEN MM. ACE inhibitor fetopathy and hypocalvaria: the kidney-skull connection. *Teratology*. 44(5):485-95, 1991.

BARTKE A, GOLDMAN BD, BE F, DALTERIO S. Effects of prolactin (PRL) on pituitary and testicular function in mice with hereditary PRL deficiency. *Endocrinology*, 101(6):1760-6, 1977.

BECKMANN DA, BRENT RL. Teratogenesis: alcohol, angiotensin-converting-enzyme inhibitors, and cocaine. *Current Opinion on Obstetrics and Gynecology*, (2):236-45, 1990.

BEEVERS G, LIP GY, O'BRIEN E. ABC of hypertension: The pathophysiology of hypertension. *BMJ*, 322(7291):912-6, 2001.

BERNE RM & LEVY MN, Koeppen BM, Stanton BA. Seção: O Sistema Endócrino. In: Fisiologia. Ed. Elsevier, 6<sup>a</sup> ed, 2009.

BIALEK M, ZAREMBA P, BOROWICZ KK, CZUCZWAR SJ. Neuroprotective role of testosterone in the nervous system. *Polish Journal of Pharmacology*, 56(5):509-18, 2004.

BILBO SD, TSANG V. Enduring consequences of maternal obesity for brain inflammation and behavior of offspring. *FASEB Journal*, 24:2104-2115, 2010.

BLAIR NJ, THOMPSON JM, BLACK PN. Risk Factors for obesity in 7-year-old European children: Auckland Birth-weight Collaborative Study. *Archives of Diseases in Childhood*, 92: 866-871, 2007.

BLUMBERG S, HABA D, SCHROEDER M, SMITH GP, WELLER A. Independent ingestion and microstructure of feeding patterns in infant rats lacking CCK-1 receptors. *American Journal of Regulatory, Integrative and comparative Physiology*, 290(1): R208-18, 2006.

BOLUMAR F, OLSEN J, REBAGLIATO M, SAEZ-LLORET I, BISANTI L. Body mass index and delayed conception: a European multicenter study on infertility and subfecundity. *American Journal of Epidemiology*, 151: 1072-1079, 2000.

BONEY CM, VERMA A, TUCKER R, VOHR BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics*, 115(3):290-6, 2005.

BOWMAN SA & VINYARD BT. Fast food consumption of US adults: impact on energy and nutrient intakes and overweight status. *Journal of the American College of Nutrition*, 23:163-68, 2004.

BRAY GA. Obesity and reproduction. *Human Reproduction*, 12 (1):26-32, 1997.

BREIGERON MK, LUCION AB, SANVITTO GL. Effects of renovascular hypertension on reproductive in male rats. *Life Sciences*, 80:1627-1634, 2007.

BRIDGES RS. Long-term effects of pregnancy and parturition upon maternal responsiveness in the rat. *Physiology and Behavior*, 14: 245–249, 1985.

BRINK M, ANWAR A, DELAFONTAINE P. Neurohormonal factors in development of catabolic-anabolic imbalance and cachexia. *International Journal of Cardiology*, 85:111-121, 2002.

BROWNSON RC, BOEHMER TK, LUKE DA. Declining rates of physical activity in the United States: what are the contributors? *Annual Review of Public Health*, 26:421-43, 2005.

BRÜNNING JC, GAUTAM D, BURKS DJ, GILLETE J, SCHUBERT M, ORBAN PC, KLEIN R, KRONE W, MÜLLER-WIELAND D, KAHN CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 289(5487):2122-5, 2000.

BUTLER AE, JANSON J, BONNER-WIER S, RITZEL R, RIZZA RA, BUTLER PC. Cell deficit and increased cell-apoptosis in human with type 2 diabetes. *Diabetes*, 52:102–10, 2003.

CARLSON SH, SHELTON J, WHITE CR, WYSS JM. Elevated sympathetic activity contributes to hypertension and salt sensitivity in diabetic obese Zucker rats. *Hypertension*, 35(1pt2):403-408, 2000.

CARVALHO-FILHO MA, CARVALHEIRA JBC, VELLOSO LA, SAAD MJA. Cross-talk das vias de sinalização de insulina e angiotensina II: Implicações com a associação entre diabetes mellitus e hipertensão arterial e doença cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, 51 (2): 195-203, 2007.

CASSIS LA, MARSHALL DE, FETTINGER MJ, ROSENBLUTH B, LODDER RA. Mechanisms contributing to angiotensin II regulation of body weight. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 274: 867-76, 1998.

CASSIS LA, HELTON M, ENGLISH V, BURKE G. Angiotensin II regulated oxygen consumption. *American Journal of Regulatory, Integrative and comparative Physiology*, 282: R445-R453, 2002.

CATALANO PM, THOMAS A, HOUSTON-PRESLEY I. Increased fetal adiposity: a very sensitive marker of abnormal in utero development. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 189: 1698- 1704, 2003.

CECCONELLO AL, RAINEKI C, SEBEN V, LUCION AB, SANVITTO GL. Effect of acute stress on sexual behavior in female rats: participation of the central angiotensinergic system. *Behavioral Brain Research*, 207(2):429-33, 2010.

CESARETTI MLR & KOHLMANN O Jr. Modelos experimentais de resistência à insulina e obesidade: Lições aprendidas. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabolismo*, 50(2); 190-197, 2006.

CHAMPAGNE FA, FRANCIS DD, MAR A, MEANEY MJ. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. *Physiology and Behavior*, 79: 359-371, 2003.

CHAN JM, RIMM EB, COLDITZ GA, STAMPFER MJ, WILLETT WC. Obesity, fat distribution and weight gain as risk factors for clinical diabetes in men. *Diabetes Care*, 17: 961-69, 1994.

CHAN P, LIU JC, TONG YC, CHEN YJ, WANG CC, TOMLINSON B, CHENG JT. Effects of losartan on the sexual behavior of male rats. *Pharmacology*, 58(3):132-9, 1999.

CHEN H, SIMAR D, LAMBERT K, MERCIER J, MORRIS MJ. Maternal and postnatal overnutrition differentially impact appetite regulators and fuel metabolism. *Endocrinology*, 149:5348-5356, 2008.

CHAVES EV, FRASSON DF, MARTINS-SANTOS MÊS, BOSCHINI RP, GAROFALO MAR, FESTUCCIA WTL, KETTELHUT EC, MIGLIORINI RH. Interactions Glyceroneogenesis Is Reduced and Glucose Uptake Is Increased in Adipose Tissue from Cafeteria Diet-Fed Rats Independently of Tissue Sympathetic Innervation. *The Journal of Nutrition, Physiology and Metabolism*, 2475-2480, 2006.

CHRISTEN Y, WAEBER B, NUSSBERGER J, PORCHET M, BORLAND RM, LEE RJ, MAGGON K, SHUM L, TIMMERMANS PB, BRUNNER HR. Oral administration of DuP 753, a specific angiotensin II receptor antagonist, to normal male volunteers. Inhibition of pressor response to exogenous angiotensin I and II. *Circulation*, 83(4):1333-42, 1991.

CHUGHTAI B, LEE RK, TE AE. Metabolic syndrome and sexual dysfunction. *Current Opinion in Urology*, 21(6):514-518, 2011.

CHUNG O, STOLL M, UNGER T. Physiologic and pharmacologic implications of AT1 versus AT2 receptors. *Blood Pressure*, 2: 47-52, 1996.

CLEGG DJ, RIEDY CA, SMITH KA, BENOIT SC, WOODS SC. Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes*, 52:682-687, 2003.

CONNOR KL, VICKERS MH, BELTRAND J, MEANEY JM, SLOBODA DM. Nature, nurture or nutrition? Impact of maternal nutrition on maternal care, offspring development and reproductive function. *Journal of Physiology*, 590 (9): 2167-2180, 2012.

de OLIVEIRA E, FAGUNDES ATS, BONOMO IT, CURTY FH, PASSOS MCF, de MOURA EG, LISBOA PC. Acute and chronic leptin effect upon in vivo rat thyroid iodide uptake. *Life Sciences*, 81: 1241-1246, 2007.

de PAULA RB, da SILVA AA, HALL JE. Aldosterone antagonism attenuates obesity-induced hypertension and glomerular hyperfiltration. *Hypertension*, 43: 41-7, 2004.

de SOUZA MA, CENTENARO LA, MENEGOTTO PR, HENRIQUES TP, BONINI J, ACHAVAL M, LUCION AB. Prenatal stress produces social behavior deficits and alters the number of oxytocin and vasopressin neurons in adult rats. *Neurochemical Research*, 38(7):1479-89, 2013.

DIETZ WH. Critical periods in childhood for the development of obesity. *American Journal of Clinical Nutrition*, 59(5):955-9, 1994.

DONADIO MVF, KUNRATH A, COREZOLA KL, FRANCI CR, ANSELMO-FRANCI JÁ, LUCION AB, SANVITTO GL. Effects of acute stress on the day of proestrus on sexual behavior and ovulation in female rats: participation of the angiotensinergic system. *Physiology and Behavior*, 92:591-600, 2007.

DREWETT RF, STAHAM C, WAKERLEY JB. A quantitative analysis of the feeding behavior of suckling rats. *Animal Behavior*, 22: 907, 1974.

DUMINY PC, BURGER P. Fetal abnormality associated with the use of captopril during pregnancy. *South Africa Medical Journal*, 60:805, 1981.

DZAU VJ, RE R. Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine. A paradigm shift? *Circulation*.; 89(1):493-8, 1994.

EHRENBERG HM, MERCER BM, CATALANO PM. The influence of obesity and diabetes on the prevalence of macrosomia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 191:964-968, 2004.

EHRHARDT JA, SLEPETIS RM, BELL AW. Maternal leptin is elevated during pregnancy in sheep. *Domestic Animal Endocrinology*, 21: 85-96, 2001.

ENGELI S, NEGREL R, SHARMA AM. Physiology and pathophysiology of the adipose tissue renin-angiotensin system. *Hypertension*, 35:1270-77, 2000.

ENGELI S, BÖHNKE J, GORZELNIAK K, JANKE J, SCHILING P, BADER M, LUFT FC, SHARMA AM. Weight loss and the renin-angiotensin-aldosterone system. *Hypertension*. 45(3):356-62, 2005.

ELNGLISH V, CASSIS L. Facilitation of sympathetic neurotransmission contributes to angiotensin regulation of body weight. *Journal of Neural Transmission*, 106:631-644, 1999.

FAROOQI IS, KEOGH JM, KAMATH S, JONES S, GIBSON WT, TRUSSELL R, JEBBSA, LIP GY, O'RAHILLY S. Partial leptin deficiency and human adiposity. *Nature*, 414(6859):34-5, 2001.

FÉRÉZOU-VIALA J, ROY AF, SEROUGNE C, GRIPOIS D, PARQUET M, BAILLEUX V, GERTLERA, DELPLANQUE B, DIJANE J, RIOTTOT M, TAOUIS M. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *American Journal of Regulatory, Integrative and comparative Physiology*, 293: R1056-R1062, 2007.

FERRARIO CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.*; 7(1):3-14, 2006.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin stimulation of the Central Nervous System. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, 87: 117-159, 1980.

FLEGAL KM, GRAUBARD BI, WILLIAMSON DF, GAIL MH. Cause-specific excess deaths associates with underweight, overweight and obesity. *JAMA*, 298:2028-37, 2007.

FORESTA C, DI MA, PAGANO C. Insulin-like factor 3 as a marker of testicular function in obese man. *Clinical Endocrinology*, 71(5):722-726, 2009.

FREEMAN ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiology Reviews*, 80(4):1523-631, 2000.

FREIDENBERG GR, REICHART D, OLEFSKY JM, HENRY RR. Reversibility of defective adipocyte insulin receptor kinase activity in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Effect of weight loss. *Journal of Clinical Investigation*, 82: 1398–1406, 1988).

FRISH RE. Body fat, menarche, fitness and fertility. *Human Reproduction*, 2: 2521-533, 1987.

FUKUDA N, SATOH C, HU WY, NAKAYAMA M, KISHIOKA H, KANMATSUSE K. Endogenous angiotensin II suppresses insulin signaling in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats. *Journal of Hypertension*, 19(9): 1651-1659, 2001.

GANONG WF. Blood, pituitary, and brain rennin-angiotensin system and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 14(3):223-249, 1993.

GANONG WF. Reproduction and the rennin-angiotensin system. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 19(2):241-250, 1995.

GARCIA-DIAZ DF, ARELLANO AV, MILAGRO FI, MORENO-ALIAGA MJ, PORTILLO MP, MARTINEZ JA, CAMPION J. Glucose and insulin modify thrombospondin 1 expression and secretion in primary adipocytes from diet-induced obese rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 67(3):453-61, 2011.

GEIGER BM, CAPPELLUCCI LA, POTHOS EN. Effects of obesogenic intrauterine environment on brain reward systems in the offspring. *Appetite*, 54(3), 631-631, 2010.

GIACCHETTI G, FALOIA E, MARINIELLO B. Overexpression of the renin-angiotensin system in human visceral adipose tissue in normal and overweight subjects. *American Journal of Hypertension*, 15:381-88, 2002.

GOLDEN NH, SHENKER IR. Amenorrhea in anorexia nervosa. Neuroendocrine control of hypothalamic dysfunction. *International Journal of Eating Disorders*, 16(1):53-60, 1994.

GOODFRIEND TL, KELLEY DE, GOODPASTER BH, WINTERS SJ. Visceral obesity and insulin resistance are associated with plasma aldosterone levels in women. *Obesity Research*, 7(4):355-62, 1999 .

GOOSSENS S, BLAAK EE, van BAAK MA. Possible involvement of the adipose tissue rennin-angiotensin system in the pathophysiology of obesity and obesity-related disorders. *Obesity Reviews*, 4:43-55, 2003.

GOOSSES GH, MOORS CCM, van der ZIJL NJ, VENTECLEF N, ALILI R, JOCKEN JWE, ESSERS Y, CLEUTJENS JP, CLÉMENT K, DIAMANT M, BLAAK EE. Valsartan improves adipose tissue function in humans with impaired glucose metabolism: A randomized placebo-controlled double-blind trial. *PIOS ONE*, 7(6): e33930, 2012

GORSKI JN, DUNN-MYNNEL AA, HARTMAN TG, LEVIN BE. Postnatal environment overrides genetic and prenatal factors influencing offspring obesity and insulin resistance. *American Journal of Physiology, Regulatory, Comparative Physiology*, 291: R778, 2006.

GOULARTE JF, FERREIRA MBC, & SANVITTO GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *British Journal of Nutrition*, 108(8), 1511-1518, 2012.

GOULIS DG, TARLATZIS BC. Metabolic syndrome and reproduction: testicular function. *Gynecology and Endocrinology*, 24(1): 33-39, 2009.

GRIENDLING KK, MURPHY TJ, ALEXANDER RW. Molecular biology of the renin-angiotensin system. *Circulation*; 87: 1816-1828, 1993.

GROSVENOR CE AND WHITWORTH N. Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat. *Journal of Dairy Sciences*, 57: 900–904, 1986.

GRUNDY SM. Metabolic syndrome pandemic. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 28; 629-636, 2008.

GUINARD JP, BURGNER F, CALAME A. Persistent anuria in a neonate: s side effect of captopril? *International Journal of Pediatric Nephrology*, 2:133, 1981.



GUO F, JEN KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiology and Behavior*, 57: 681-686, 1995.

HALL LF, NEUBERT AG. Obesity and pregnancy. *Obstetrical and Gynecology Survey*, 60: 253-260, 2005.

HARDING SM, MCGINNIS MY. Effects of testosterone in the VMN on copulation, partner preference, and vocalizations in male rats. *Hormones and Behavior*, 43(2):327-35, 2003.

HAYASHIDA W, HORIUCHI M, DZAU VJ. Intracellular third loop domain of angiotensin II type-2 receptor. Role in mediating signal transduction and cellular function. *Journal of Biological Chemistry*, 271(36):21985-92, 1996.

HENRIKSEN EJ. Improvement of insulin sensitivity by antagonism of the rennin-angiotensin system. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 293: R974-980, 2007.

HILL JO & PETERS JC. Environmental Contributions to the obesity epidemic. *Science*, 280: 1371-73, 1998.

HILLIER TA, PEDULA KL, SCHMIDT MM, MULLEN JA, CHARLES MA, PETTITT DJ. Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diabetes Care*: 30(9):2287-92, 2007.

HINEY JK, SOWER SA, YU WH, McCANN SM, DEES WL. Gonadotropin-releasing hormone neurons in the preoptic-hypothalamic region of the rat contain lamprey gonadotropin-releasing hormone III, mammalian luteinizing hormone-releasing hormone, or both peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 99(4):2386-91, 2002.

HOENACK C, ROESEN P. Inhibition of angiotensin type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT4) in diabetic rat heart. *Diabetes*, 45 Suppl 1:S82-7, 1996 .

HOWIE GJ, SLOBODA DM, KAMAL T, VICKERS MH. Maternal nutritional history predicts obesity in adult offspring independent of postnatal diet. *Journal of Physiology*, 587 (4): 905-915, 2009.

HU FB, LI TY, COLDITZ GA, WILLET WC, MANDOS JE. Television watching and other sedentary behaviors in relation to risk of obesity and type 2 diabetes mellitus in women. *JAMA*, 289: 1785-91, 2003.

HULL EM, DOMINGUEZ JM. Sexual behavior in male rodents. *Hormones and Behavior*, 52(1):45-55, 2007.

HULL HR, DINGER MK, KNEHANS AW, THOMPSON DM, FIELDS DA. Impact of maternal body mass index on neonate birthweight and body composition. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*;198(4):416, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2004). Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF) 2002-2003. Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional no Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2002analise/analise.pdf>. Acessado em 06/03/2011.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2010). Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009. Antropometria e Estado Nutricional de Crianças, Adolescentes e Adultos no Brasil. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Disponível em [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_encaa/pof\\_20082009\\_encaa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_encaa/pof_20082009_encaa.pdf). Acessado em 06/03/2011.

ISIDORI AM, CAPRIO M, STROLLO F et al. leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(10): 36-73-3680, 1999.

JANKE J, ENGELI S, GORZELNIAK K, LUFT FC, SHARMA AM. Mature adipocytes inhibit in vitro differentiation of human preadipocytes via angiotensin type 1 receptors. *Diabetes*, 51(6):1699-707, 2002.

JIN L, ZHANG S, BURGUERA BG, COUCE ME, OSAMURA RY, KULIG E, LLOYD RV. Leptin and leptin receptor expression in rat and mouse pituitary cells. *Endocrinology*, 141: 333–339, 2000.

JÖHREN O, SANVITTO GL, EGIDY G, SAAVEDRA J. Angiotensin II At<sub>1A</sub> receptor mRNA expression is induced by estrogen-progesterone in dopaminergic neuron of the female rat arcuate nucleus. *The Journal of Neurosciences*, 17(21): 8283-92, 1997.

KAADS R, LUKANOVA A, KURZER MS. Obesity, endogenous hormones, and endometrial câncer risk: a synthetic review. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 11: 1531-1543, 2002.

KAFFMAN A, MEANEY MJ. Neurodevelopmental sequelae of postnatal maternal care in rodents: clinical and research implications of molecular insights. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 48(3-4):224-44, 2007.

KAHN SE. The relative contributions of insulin resistance and -cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetologia* 46:3–19, 2003.

KENNEDY GC, MITRA J. Body weight and food intake as initiating factors for puberty in the rat. *Journal of Physiology*, 166:408-418, 1963.

KENNEDY DJ, KUCHIBHOTLA S, WESTFALL KM, SILVERSTEINRL, MORTON RE, FEBBRAIO M. A CD36-dependent pathway enhances macrophage and adipose tissue inflammation and impairs insulin signalling. *Cardiovascular Research*, 89(3): 604-13, 2011.

KHANUN A, DUFAU ML. Angiotensin II receptors and inhibitory actions in Leydig cells. *Journal of Biological Chemistry*, 263(11):5070-4, 1988.

KJELDTSEN SE, JULIUS S, MANCIA G, McLNNES GT, HUA T, WEBER MA, COCA A, EKMAN S, GIRERD X, JAMERSON K, LAROCHELLE P, MacDONALD TM, SCHMIEDER RE, SCHORK MA, STOLT P, VISKOPER R, WIDIMSKY J, ZANCHETTI A. Effects of valsartan compared to amlodipine on preventing type 2 diabetes in high-risk hypertensive patients: the VALUE trial. *Journal of Hypertension*, 24(7):1405-12, 2006.

KOKAY IC, PETERSEN SL, GRATTAN DR. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology*, 152(2):526-35, 2011.

KONDO Y, ARAI Y. Functional association between the medial amygdala and the medial preoptic area in regulation of mating behavior in the male rat. *Physiology and Behavior*, 57(1):69-73, 1995.

KOYUAMA R, SUGANAMI T, NISHIDA J, TANAKA M, TOYODA T, KISO M, CHIWATA T, MIYAMOTO Y, YOSHIMASA Y, FUKAMIZU A, HORIUCHI M, HIRATA Y, OGAWA Y. Attenuation of diet-induced weight gain and adiposity through increased energy expenditure in mice lacking angiotensin II type 1a receptor. *Endocrinology*, 146(8): 3481-9, 2005.

KRETSCHMER BD, SCHELING P, BEIER N, LIEBCHER C, TREUTEL S, KRÜGER N, SCHOLZ H. HAUS A. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sciences*, 76:1553-73, 2005.

KUMANYIKA S, OBARZANEK E, STETTLER N. et al. Population-based prevention of obesity: the need for comprehensive promotion of healthful eating, physical activity, and energy balance: a scientific statement from American heart association council on epidemiology and prevention, interdisciplinary committee for prevention (formerly the expert panel on population and prevention science) *Circulation*, 118(4): 428-464, 2008,

KURTZ TW, PRAVANEK M. Antidiabetic mechanisms of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists: beyond the renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension*, 22(12):2253-61, 2004 .

LAAKSONEN DE, NISKANEN L, PUNNOMEN K et al. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *European Journal of Endocrinology*, 146(6): 601-608, 2003.

LA COURSIERE D, BLOEBAUM I, DUNCAN J, VARNER M. Population-based trends and correlates of maternal overweight and obesity, Utah 1991-2001. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 192(3):832-839, 2005.

LAKE JK, POER C, COLE TJ. Women's reproductive health: the role of body mass index in early and adult life. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders*, 21(6): 432-438, 1997.

LASAITIENE D, CHEN Y, ADAMS MA, FRIBERG P. Further insights into the role of angiotensin II in kidney development. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 26:197-204, 2006.

LASTRA G, MANRIQU C, McFARLANE SI, SOWERS JR. Cardiometabolic syndrome and chronic kidney disease. *Current Diabetes Report*, 6(3):207-12, 2006 .

LAWLOR DA, TIMPSON NJ, HARBORD RM. Exploring the developmental overnutrition hypothesis using parental-offspring associations and FTO as an instrumental variable. *PLoS Medicine*, 3: e33, 2008.

LEUNG PS. Mechanisms of protective effects induced by blockade of the renin-angiotensin system: novel role of the pancreatic islet angiotensin-generating system in Type 2 diabetes. *Diabetic Medicine*, 24(2):110-6, 2007.

LENKEI Z, PALKOVITS M, CORVOL P, LLORENS-CORTÉSÈS C. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Frontiers in Neurology*, 18(4):383-439, 1997.

LEVIN BE & DUNN-MEYNELL AA. Reduced central leptin sensitivity in rats with diet-induced obesity. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 283:941-48, 2002.

LEVIN BE, DUNN-MEYNELL AA, BANKS AA, BANKS WA. Obesity-prone rats have normal blood-brain barrier transport but defective central leptin signaling prior to obesity onset. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 286:143-50, 2004.

LEVINE, S. Primary social relationships influence the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Physiology and Behavior* 73: 255-260, 2001.

LEVINE S. Influence of psychosocial variables on the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *Europa Journal of Pharmacology*, 405:149-160, 2001.

LICATA G, SCAGLIONE R, GANGUZZA A, CORRAO S, DONATELLI M, PARRINELLO G, DICHIARA MA, MERLINO G, CECALA MG. Central obesity and hypertension. Relationship between fasting serum insulin, plasma renin activity, and diastolic blood pressure in Young obese subjects. *America Journal of Hypertension*, 7: 314-320, 1994.

LINDSTEIN AM, PASKER D, JONG PC, DE BOER EJ, BURGER CW, JANSEN CA, BRAAT DD, VAN LEEUWEN FE. Effects of subfertility cause, smoking

and body weight on the success rate of IVF. *Human Reproduction*, 20:1867-1875, 2005.

LLADÓ I, PICO C, PALOU A, PONS A. Protein and amino acid intake in cafeteria fed obese rats. *Physiology and Behavior*, 58:513-519, 1995.

MacDONALD AA, HERBINSON GP, SHOWELL M, FARQUHAR CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Human Reproduction Update*, 16(3):293-311, 2010.

MARTIN RA, JONES KL, MENDOZA A, BARR M Jr, BENIRSCHKE K. Effect of ACE inhibition on the fetal kidney: decreased renal blood flow. *Teratology*. 46(4):317-21, 1992.

MARTINS MR, VIEIRA AK, de SOUZA EP, MOURA AS. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *Journal of Endocrinology*, 198(3):591-8, 2008.

MATSUBARA H. Pathophysiological role of angiotensin II type 2 receptor in cardiovascular and renal diseases. *Circulation Research*, 83: 1182-1191, 2002.

MAYES JS, WATSON GH. Direct effects of sex steroids hormones on adipose tissues and obesity. *Obesity Reviews*, 5:197–216, 2004.

McGINNIS MY, DREIFUSS RM. Evidence for a role of testosterone-androgen receptor interactions in mediating masculine sexual behavior in male rats. *Endocrinology*, 124(2):618-26, 1989.

MacGREGOR DP, MURONE C, SONG K, ALLEN AM, PAXINOS G, MENDELSON FA. Angiotensin II receptor subtypes in the central nervous system. *Brain Research*, 675(1-2):231-240, 1995.

McKINLEY MJ, McMALLEN RM, PENNINGTON GL, SMARDENCAS A, WEISINGER RS, OLDFIELD BJ. Physiological actions of angiotensin II mediated by AT<sub>1</sub> and AT<sub>2</sub> receptors in the brain. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology – Supplement 3*: 99-104, 1996.

McMILLEN IC, ADAM CL, MUHLHAUSER BS. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *Journal of physiology*, 565: 9-17, 2005.

McMURRAY JJ, HOLMAN RR, HAFFNER SM, BETHEL MA, HOLZHAUER B. Effect of valsartan on the incidence of diabetes and cardiovascular events. *New England Journal of Medicine*, 362: 1477-1490, 2010.

MERCER JG, HOGGARD N, WILLIAMS LM, LAWRENCE CB, HANNAH LT, TRAYHURN P. Localization of leptin receptor mRNA and the long form splice variant (Ob-Rb) in mouse hypothalamus and adjacent brain regions by in situ hybridization. *FEBS Letter*, 3; 387(2-3):113-6, 1996.

MICHALAKIS K, MINTZIORI G, KAPRARA A, TARLATZIS BC, GOULIS D. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism*, 62: 457-478, 2013.

MITCHELL GW & ROGERS JJr. The influence of weight reduction on amenorrhea in obese women. *New England Journal of Medicine*, 249: 835-837, 1953.

MITCHEL SL, EPSTEIN LH. Changes in taste and satiety in dietary-restrained women following stress. *Physiology and Behavior*, 60(2):495-9, 1996.

MOORE KL, PERSAUD TVN. *Embriologia básica*. 7 ed. Rio de Janeiro, RJ. Editora Elsevier, 2008.

MOTHE I, VAN OBBERGHEN E. Phosphorylation of insulin receptor substrate-1 on multiple serine residues, 612, 632, 662 and 731 modulates insulin action. *Journal of Biological Chemistry*, 271: 11222-11227, 1996.

MULLER DN, DECHEND R, MERVAALA EM, PARK JK, SCHMIDT F, FIEBELER A, THEUER J, BREU V, GANTEN D, HALLER H, LUFT FC. NF-kappaB inhibition ameliorates angiotensin II-induced inflammatory damage in rats. *Hypertension*, 35:193-201 2000.

MUNDY AL, HAAS E, BHATTACHARYA I, WIDMER CC, KRETZ M, HOFMANN-LEHMANN, MINOTTI R, BARTON M. Fat intake modifies vascular responsiveness and receptor expression of vasoconstrictors: implications for diet-induced obesity. *Cardiovascular Research*, 73(2):368-375, 2007.

NADARELI EK, PICKAVANCE LC, WILDING LC, WILLIAMS G. Diet-induced endothelial dysfunction in the rat is dependent of the degree of increase in total body weight. *Clinical Sciences*, 100: 635-41, 2001.

NAFTOLIN F. Understanding the bases of sex differences. *Science*, 211(4488), 1981.

NATHAN BM, MORAN A. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Current Opinion in Endocrinology, diabetes and Obesity*, 15:21-29, 2008.

NELSON RJ. Male Reproductive Behavior. In: An Introduction to Behavior Endocrinology. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA, 1995.

NG SF, LIN RC, LAYBUTT DR, BARRES R, OWENS JA, MORRIS MJ. Chronic high-fat diet in fathers programs  $\beta$ -cell dysfunction in female rat offspring. *Nature*, 467(7318): 963-6, 2010.

NIELSEN SJ, POPKIN BM. Changes in beverage intake between 1977 and 2001. *American Journal of Preventive Medicine*, 27:205-10, 2004.

NIELSEN SJ, SEIGA-RIZ AM, POPKIN BM Trends in food locations and sources among adolescents and young adults. *Preventive Medicine* 35:107-113, 2002;

NHI- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1985); publication no. 85-23 (revised). Bethesda, MD: National Institutes of Health.

NHI- National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute (1998) Clinical guidelines on the identification, evaluation, and treatment of overweight and obesity in adults:the evidence report. Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, PublicHealth Service.

NIVOIT P, MORENS C, VAN ASSCHE FA, JANSEN E, POSTON L, REMACLE C, REUSENS B. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*, 52(6):1133-42, 2009.

NIH- National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1985); publication no. 85-23 (revised). Bethesda, MD: National Institutes of Health.

NOHR EA, VAETH M, BAKER JL, SORENSEN TLA, OLSEN J, RASMUSSEN KM. Combined associations of prepregnancy body mass index and gestational weight gain with the outcome of pregnancy. *American Journal of Clinical Nutrition*, 87(6):1750-9, 2008.

NUMAN M & INSEL TR. The neurobiology of parental behavior. New York: Springer; 2003.

NUMAN M. Motivacional systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. *Developmental Psychobiology*, 49(1): 12-21, 2006.

OGDEN CL, YANOVSKI S Z, CARROLL MD, FLEGAL KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology*, 132(6), 2087-2102, 2007.

OGDEN CL, CARROLL MD, CURTIN LR, LAMB MM, FLEGAL KM Prevalence of High BodyMass Index in US Children and Adolescents, 2007–2008. *JAMA* 303:242–249, 2010.

OKEN E, KLEINMAN KP, BELFORTt MB, HAMMITT JK, GILLMAN MW. Associations of gestational weight gain with short- and longer-term maternal and child health outcomes. *American Journal of Epidemiology*, 170(2):173-80, 2009.

OLIVARES-REYES JA, ARELLANO-PLANCARTE A, CASTILLO-HERNANDEZ R. Angiotensin II and the development os insulin resistance: Implications for diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 302:128-139, 2009.

PALMER AA, STEELE MK, SHACKELFORD RL, GANONG WF. Intravenous losartan inhibits the increase in plasma luteinizing hormone and water intake produced by intraventricular angiotensin II. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.*; 205(3):263-6, 1994.

PALMER NO, FULLSTON T, MITCHELL M, SETCHELL BP, LANE M. SIRT6 in mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity. *Reproduction, Fertility and Development*. 23(7):929-39, 2012.

PALS DT, COUCH SJ. Renin release induced by losartan (DuP 753), an angiotensin II receptor antagonist. *Clinical and Experimental Hypertension*, 15(1):1-13, 1993.

PAREDES RG, HIGLAND L, KARAM P. Socio-sexual behavior in male rats after lesions of the medial preoptic area: evidence for reduced sexual motivation. *Brain Research*, 618(2):271-6, 1993.

PARSONS TJ, POWER C, MANOR O. Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. *British Medical Journal*, 323: 1331-1335, 2001.

PASQUALI R, PELUSI C, GENGHINI S, CACCIARI M, GAMBIERI A. Obesity and reproductive disorders in women. *Human Reproduction Update*, 9: 359-372, 2003.

PAVLOVICH CP, KING P, GOLDSTEIN M. Evidence of a treatable endocrineopathy in infertile men. *Journal of Urology*, 165 (3): 837-841, 2001.

PEDERSEN EB, DANIELSEN H, JENSEN T, MADSEN M, SORENSEN SS, THOMSEN OO. Angiotensin II, aldosterone and arginine vasopressin in plasma in congestive heart failure. *European Journal of Clinical Investigation*, 16: 56-60, 1986.

PEREIRA MA, KARTASHOV AI, EBBELING CB, VAN HORN L, SLATTERY ML, JACOBS DR Jr & LUDWIG DS. Fast-food habits, weight gain, and insulin resistance (the CARDIA study): 15-year prospective analysis. *Lancet*, 365:36-42, 2005.

PIMENTA APAA & PALMA A. Perfil epidemiológico da obesidade em crianças: relação entre televisão, atividade física e obesidade. *Revista Brasileira de Ciência e Movimento*, 9(4): 19-24, 2001.

PINTEROVA L, KRIZANOVA O, ZORAD S. Rat epididymal fat tissue express all components of the renin-angiotensin system. *General Physiology and Biophysics*, 19(3):329-34, 2000.

POLIDORI C, CICCOCIOPPO R, POMPEI P, CIRILLO R, MASSI M. Functional evidence for the ability of angiotensin AT1 receptor antagonists to cross the blood-brain barrier in rats. *European Journal of Pharmacology*, 307(3):259-67, 1996 .

POLIFKA, JE. Is there an embryopathy associated with first-trimester exposure to angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists? A critical review of the evidence. *Birth Defect Research*, 94: 576-598, 2012.

PORTER JP, POTRATZ KR. Effect of intracerebroventricular angiotensin II on body weight and food intake in adult rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 287:R422-R428, 2004.



PRADA PO, ZECCHIN HG, GSPARETTI AL, TORSONI MA, BUENO M, HIRATA AE, AMARAL MEC, HÖER NF, BOSCHERO AC, SAAD MJA. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1<sup>ser307</sup> phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology*, 146:1576-1587, 2005.

PRYCE CR, BETTSCHEN D, FELDON J. Comparison of the effects of early handling and early deprivation on maternal care in the rat. *Developmental Psychobiology*, 38(4):239-51, 2001.

PURCELL RH, SUN B, PASS LL, POWER ML, MORAN TH, TAMASHIRO KLK. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiology and Behavior*, 104: 474-479, 2011.

QUAN, A. Fetopathy associated with exposure to angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor antagonists. *Early Human Development*, 82:23-28, 2006.

QUINLAN JT, PHILLIPS MI. Immunoreactivity for an angiotensin II-like peptide in the human brain. *Brain Research.*; 205(1):212-8, 1981.

RAJKOWA M, NEARY RH, KUMPATLA P, GAME FL, JONES PW, OBHRAI MS, CLAYTON RN. Altered composition of high density lipoproteins in women with the polycystic ovary syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82(10):3389-94, 1997.

RASMUSSEN KM, YAKTINE A. Weight gain during pregnancy: Reexamining the guidelines. *The National Academies Press*. Washington, USA, 2009.

REID, I. A. The renin-angiotensin system. *Annual Review of Physiology*, 40: 377-410, 1978.

RINCON-CHOLE H, KASINATH BS, GORIN Y, ABOUD HE. Angiotensin II and growth factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Kidney International Supplement*, 82: 8-11, 2002.

RITTMASER RS, DESHWALL N, LEHMAN L. The role of adrenal hyperandrogenism, insulin resistance, and obesity in the pathogenesis of polycystic ovarian syndrome. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 76(5):1295-300, 1993.

RODRIGUES AL, DE MOURA EG, FONSECA PASSOS MC, POTENTE DUTRA SC, LISBOA PC. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *Journal of physiology*, 587:2647-2661, 2009.

RODRIGUEZ A. Maternal pre-pregnancy obesity and risk for inattention and negative emotionality in children. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*, 51(2):134–143, 2010.

RODRÍGUEZ-MANZO G, PELLICER F, LARSSON K, FERNÁNDEZ-GUASTI A. Stimulation of the medial preoptic area facilitates sexual behavior but does not reverse sexual satiation. *Behavioral Neuroscience*, 114(3):553-60, 2000.

ROLLS BJ, ROWE EA. Pregnancy and lactation in the obese rat: Effects on maternal and pup weight. *Physiology and Behavior*, 28: 393-400, 1982.

ROLLS BA, GURR MI. Lactations in lean and obese rats: Effect of cafeteria diet feeding and dietary obesity and milk composition, *Physiology and Behavior*, 38: 185-190, 1986.

SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocrinology Reviews*, 13: 329-380, 1992.

SAGAE SC, MENEES EF, BONFLEUR ML, VANZELA EC, ZACHARIAS P, LUBCZEUSKI C, FRANCI CR, SANVITTO GL. Early onset of obesity induces reproductive deficits in female rats. *Physiology and Behavior*, 105:1104 -1111, 2012.

SAGAE SC, LUBACZEUSKI C, ZACHARIAS P, BONFLEUR ML, FRANCI CR, SANVITTO GL. Prevention of metabolic disorders and reproductive performance deficits by the blockade of Angiotensin II AT1 receptor in female rats fed with cafeteria diet. *Physiology and Behavior*, 119 (2)1-8, 2013.

SALTIEL AR, KAHN CR. Insulin signaling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*, 444: 875-80, 2001.

SALVI R, CASTILLO E, VOIROL MJ, GLAUSER M, REY JP. GAILLARD RC, VOLLENWEIDER P, PRALONG FP. Gonadotropin-releasing hormone expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogenactivated protein kinase pathway. *Endocrinology*, 147:816–826, 2006.

SAMPEY BP, VANHOOSE AM, WINFIELD HM, FREEMERMAN AJ, MUEHLBAUER MJ, FUEGER PT, NEWGARD CB, MAKOWSKIL. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity*, 19(6): 1109-17, 2011.

SAMUELSON AM, MATTHEWS PA, ARGENTON M. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension and insulin resistance a novel murine model of developmental programming. *Hypertension*, 51: 383-392, 2008.

SCHRÖDER H, FITO M, COVAS MI; REGICO R. Association of fast food consumption with energy intake, diet quality, body mass index and the risk of obesity in a representative Mediterranean population. *Brazilian Journal of Nutrition*, 98: 1274-80, 2007.

SCOTT MM, LACHEY JL, STERNSON SM, LEE CE, ELIAS CF, FRIEDMAN JM, ELMQUIST JK. Leptin targets in the mouse brain. *Journal of Comparative Neurology*, 514(5): 518-532, 2009.

SETOGUCHI Y, OHNUKI T, RASHID M, NAKAMURAT, HATTORI K, NAGAMOTO T, WATANABE K, MITOMI A, NAKAZAWA M. Effects of chronic administration of sarpogrelate on systolic blood pressure of spontaneously hypertensive rats: comparison with quinapril. *Pharmacology*, 64(2):71-5, 2002.

SHAFAT A, MURRAY B, RUMSAY D. Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite*, 52(1):34-8, 2009.

SHARMA AM, PISCHON T, HARDT A, KUNZ I, LUFT FC. Hypothesis: Beta-adrenergic receptor blockers and weight gain: A systematic analysis. *Hypertension*, 37: 250-254, 2002.

SHIMABUKURO M, HIGA M, ZHOU YT, WANG MY, NEWGARD CB, UNGER RH. Lipoapoptosis in beta-cells of obese prediabetic fa/fa rats. Role of serine palmitoyltransferase overexpression. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49):32487-90, 1998.

SHIMIZU Y, YAMAZAKI M, NAKANISHI K, SAKURAI M, SANADA A, TAKEWAKI T. Enhanced responses of the chorda tympani nerve to sugars in the ventromedial hypothalamic obese rat. *Journal of Neurophysiology*, 90:128-33, 2003.

SHIUCHI T, IWAI M, LI HS, WU L, MIN LJ, LI JM, OKUMURA M, CUI TX, HORIUCHI M. Angiotensin II type-1 receptor blocker valsartan enhances insulin sensitivity in skeletal muscles of diabetic mice. *Hypertension*. ;43(5):1003-10, 2004.

SIEGA-RIZ AM, VISWANATHAN M, MOOS MK, DEIERLEIN A, MUMFORD S, KNAACK J, THIEDA P, LUX LJ, LOHR KN. A systematic review of outcomes of maternal weight gain according to the Institute of Medicine recommendations: birthweight, fetal growth, and postpartum weight retention. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 201(4):339.e1-14, 2009.

SIMMONS R. Perinatal programming of obesity. *Seminars in Perinatology*, 32: 371-374, 2008.

SIRAGY HM. The role of the AT2 receptor in hypertension. *American Journal of Hypertension*, 13: 62-67, 2000.

SIRETT N E, McLEAN A S, BRAY J J, HUBBARD J I. Distribution of Angiotensin II receptors in rat brain. *Brain Research*, 122:299-312, 1977.; 122:2

SONE M, NAGATA H, TAKEKOSHI S, OSAMURA RY. Expression and localization of leptin receptor in the normal rat pituitary gland. *Cell and Tissue Research*, 305: 351-356, 2001.

SONG K, ZHUO J, ALLEN AM, PAXINOS G, MENDELSON FA. Angiotensin II receptor subtypes in rat brain and peripheral tissues. *Cardiology*, 79 Suppl 1:45-54, 1991a.

SPEIGELMAN BM, FLIER JS. Obesity and regulation of energy balance. *Cell*, 104: 531-543, 2001.

SPETH RC, DAUBERT DL, GROVE KL. Angiotensin II: a reproductive hormone too? *Regulation Peptides*, 79(1):25-40, 1999.

STERN JM, JOHNSON SK. Ventral somatosensory determinants of nursing behavior in Norway rats. I. Effects of variations in the quality and quantity of pup stimuli. *Physiology and Behavior*, 47(5):993-1011, 1990.

STUVOLL M, GOLDSTEIN BJ, VAN HEAFTER TW. Type 2 diabetes: pathogenesis and treatment. *Lancet*, 371:2153-6, 2008.

SYKIOTIS GP, PAPAVALASSILIOU AG. Serine phosphorylation of insulin receptor substrate-1: a novel target for the reversal of insulin resistance. *Molecular Endocrinology*. 15(11):1864-9, 2001.

SWELL MF, HOUSTON-PRESLEY L, SUPER DM, CATALANO P. Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 195(4):1100-3, 2006.

SZCZYPKA MS, ZHOU Q, PALMITER RD. Dopamine-stimulated sexual behavior is testosterone dependent in mice. *Behavioural Neuroscience*, 112:1229-1235, 1999.

TANTI JF, GREMEAUX T, VAN OBERGHEN E, LE MERCHAND-BRUSTEL Y. Serine/ threonine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 modulates insulin receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 269: 6051-6957, 1994.

TAYLOR PD, POSTON L. Developmental programming of obesity on mammals. *Experimental Physiology*, 92: 287-298, 2007.

TEDESCO MA, RATTI G, MENNELLA S, MANZO G, GRIECCO M, RAINONE AC, IARUSSI D, IACONO A. Comparison of losartan and hydrochlorothiazide on cognitive function and quality of life in hypertensive patients. *American Journal of Hypertension*, 12(11 pt1):1130-1134, 1999.

TEERDS KJ, de ROOJI DG, KEIJER J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Human Reproductive Update*, 17(5):667-83, 2011.

TIMMERMANS PBMWM, WONG PC, CHIU AT, HERBLIN WF, BENFIELD P, CARINI DJ, LEE RJ, WEXLER RR, SAYE JAM, SMITH RD. Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacology Review*, 45: 205-251, 1993.

TOZUKA Y, WADA E, WADA K. Diet-induced obesity in female mice leads to peroxidized lipid accumulations and impairment of hippocampal neurogenesis during the early life of their offspring. *FASEB J*, 23(6), 1920-1934, 2009.

TSUTSUMI K, SAAVEDRA JM. Characterization and development of angiotensin II receptor subtypes (AT1 and AT2) in rat brain. *American Journal of Physiology*, 261(1 Pt 2):R209-16, 1991.

UNEMURA S, NYUI N, TAMURA K, HIBI K, YAMAGUCHI S, NAJAMARU M, ISHIGAMI T, YABANA M, KIHARA M, INOUE S, ISHII M. Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *American Journal of Hypertension*, 10: 629-633, 1997.

VASAN RS, LARSON MG, LEIP EP, KANNEL WB, LEVY D. Assessment of frequency of progression to hypertension in non-hypertensive participants in the Framingham Heart Study: a cohort study. *Lancet*, 358:1682-86, 2001.

VELKOSKA E, WARNER FJ, COLE TJ, SMITH I, MORRIS MJ. Metabolic effects of low dose angiotensin converting enzyme inhibitor in dietary obesity in the rat. *Nutrition, Metabolism & cardiovascular Diseases*, 13: 1-7, 2009.

VELLOSO LA, FOLLI F, SUN XJ, WHITE MF, SAAD MJ, KAHN CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93: 12490-12495, 1996.

WALSH RJ, SLABY FJ, POSNER BI. A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology*, 120(5):1846-1850, 1987.

WATANABE S, YAGINUMA R, IKEJIMA K, MIYAZAKI A. Liver diseases and metabolic syndrome. *Journal of Gastroenterology*, 43:509-18, 2008.

WEI S, SCHMIDT MD, DWYER T, NORMAN RJ, VENN AJ. Obesity and menstrual irregularity: associations with SHBG, testosterone, and insulin. *Obesity*, 17:1070, 2009.

WHITE CL, PISTELL PJ, PURPERA MN, GUPTA S, HISE TL, KELLER JN, INGRAM DK, MORRISON CD. NIH Public Access. *Biomedical Research*, 35(1), 3-13, 2010.

WIENER SG, SMOTHERMAN WP, LEVINE S. Influence of maternal malnutrition on pituitary-adrenal responsiveness to offspring. *Physiology and Behavior*, 17(6):897-901, 1976.

WILD S, ROGLIC G, GREEN A, SICREE R, KING H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care*, 27: 1047-1053, 2004.

WOFFORD MR & HALL JE. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. *Current Pharmaceutical Design*, 10: 3621-37, 2004.

WOOD RI. Thinking about networks in the control of male hamster sexual behavior. *Hormones and Behavior*, 32(1):40-5, 1997.

WOODS SC, SEELEY, RJ. PORTE DJr, SCHWARTZ M. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science*, 280:1378-1383, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of the WHO Consultation on Obesity. Geneva: World Health Organization; 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. ICD-10: International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. 10th Revision (2007). Disponível on-line em <http://apps.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>. Acessado em 09/09/2010.

YAMADA M, MURAMAKI K, SASAKI S, TAKAHASHI Y, OKUBO H. Soft drink intake is associated with diet quality even among young Japanese women with low soft drink intake. *Journal of American Dietary Association*, 108:1997, 2008.

YOUNG LR, NESTLEM. The contribution of expanding portion sizes to the US obesity epidemic. *American Journal of Public Health*, 92:246-9, 2002.

ZEIOALDINI S, SWARTS JJ, Van de HEIJNING BJ. A signaling role for leptin in puberty onset in female rats? *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 19(10):1239-47, 2006 Oct.

ZHANG Y, PROENCA R, MAFFEI M, BARONE M, LEOPOLD L, FRIEDMAN JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, 372(6505):425-32, 1994.

ZHANG J, ZHOU L, TANG L, XU L. The plasma level and gene expression of resistin in polycystic ovary syndrome. *Gynecological Endocrinology*, 27(12):982-7, 2011.

ZHANG S, RATTANATRAY L, MORRISON JL, NICHOLAS LM, LIE S, McMILLEN S. Maternal obesity and the early origins of childhood obesity: weighing up the benefits and costs of maternal weight loss in the periconceptional period for the offspring. *Experimental Diabetes Research*, 2011: 1-10, 2011.

ZORAD S, DOU JT, BENICKY J, HUTANU D, TYBITANCLOVA K, ZHOU J, SAAVEDRA JM. Long-term angiotensin II AT1 receptor inhibition produces adipose tissue hypotrophy accompanied by increased expression of adiponectin and PPARgamma. *European Journal of Pharmacology*, 552(1-3):112-22, 2006.

## **8. ANEXOS**

**8.1. Artigo submetido à revista *Physiology & Behavior* intitulado “The impact of maternal consumption of cafeteria diet on the offspring reproductive function”**

Manuscript Number: PHB-D-13-00521

Title: THE IMPACT OF MATERNAL CONSUMPTION OF CAFETERIA DIET ON THE OFFSPRING REPRODUCTIVE FUNCTION

Article Type: Research paper

Keywords: Cafeteria diet, maternal obesity, sexual behavior, male reproductive function, reproductive hormones.

Corresponding Author: Ms. Silvana Jacobs,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

First Author: Silvana Jacobs

Order of Authors: Silvana Jacobs; Deborah Teixeira; Cláudio F da Rocha; Marcelo A de Souza; Bruno C Aranda; Adolfo R Reis; Celso R Franci; Gilberto L Sanvitto

Abstract: Maternal obesity is a risk factor for the development of metabolic syndrome and childhood obesity and early over-nutrition seem to induce the development of pathologies in adulthood, including insulin resistance, cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus, and a higher BMI. In addition, it is known that obesity can negatively affect fertility and reproductive function in men. The objective of this work was to investigate the impact of maternal obesity induced by the consumption of cafeteria diet on metabolic, endocrine and reproductive outcomes male offspring. Body weight, abdominal fat content and concentrations of insulin, leptin, glucose and total cholesterol were analyzed in mothers. The same parameters were evaluated in pups when in adulthood, in addition to the analysis of sexual behavior, followed by measurement of plasma luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, testosterone and prolactin. Maternal consumption of cafeteria diet affected the offspring reproductive hormone regulation and such modifications were reflected on sexual performance. Also, these modifications were independent of time and the reproductive period during which mothers consumed the diet. Our results indicated, for the first time, that maternal nutrition may have a deep impact on the reproductive function of male offspring.



## 1. Introduction

Overweight and obesity are a major public health problem and have been assuming epidemic characteristics [1]. The obesity rate has grown over 75% since 1980 and about 1.5 billion of individuals are classified as obese or overweight [2], and the prevalence of obesity in children is one of the most alarming problems [3]. Data presented in the period 2007-2008 by the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) showed that 17.6% of children and teenagers between 2-19 years were obese in the United States [4]. The causes of childhood obesity are being exhaustively investigated. While changes in life style – characterized by decreased physical activity and the increase in the dense-energy foods intake – are appointed as the main causes of the global epidemic obesity [5], studies in humans and animals have suggested that some events in the early stages of life can also “program” the metabolic syndrome in the offspring of obese mothers [6-8]. Stronger influence of maternal than paternal BMI on offspring BMI observed in studies of humans may indicate an important and independent influence of intrauterine environment on the offspring adiposity [9], finally indicating maternal obesity as a risk factor for the development of metabolic syndrome and obesity in childhood [10-12]. Gestational diabetes, closely associated with maternal obesity, has also been implicated in the development of offspring obesity [13]. Risk factors to coronary disease such as dyslipidemia, hypertension and reduced glucose tolerance have been described in obese children [14], and the reflexes of early overnutrition seem to induce the development of pathologies in adulthood, including insulin resistance, cardiovascular diseases, type 2 diabetes mellitus, associated to a higher BMI [15-17]. Reinforcing the findings in humans, several surveys in animals have also shown a close relationship between maternal obesity and modifications in the offspring development, including obesity, matabolic syndrome, hiperfagia, and insulin resistance [18-21].

Besides the effects of obesity on the metabolic and cardiovascular function, studies have shown that obesity is also associated to fertility problems in men. There are growing evidences that obesity reduces the quality of sperm altering the physical and molecular structure of germ cells as well as mature sperm, both in human and animal models [23], the origin being the alterations in the levels of male reproductive hormones [24] (Palmer *et al.*, 2012). Obesity is associated with lower concentrations of sex hormone-binding globulin (SHBG), decreased circulating testosterone, a reduction of LH pulse amplitude and hyperstrogonemia [26]. Together, these factors have been linked to fertility disorders frequently observed in obese individuals [27]. However, there are still relatively few studies relating obesity to behavioral aspects of male reproduction. Furthermore, little is known, if maternal obesity may be one of the factors involved in the reproductive alterations of male offspring.

As maternal obesity is a risk factor for the development of obesity and metabolic syndrome in childhood, and that these changes may persist into adulthood, the aim of this study was to investigate the impact of maternal obesity induced by Cafeteria Diet on the metabolic, endocrine and reproductive outcomes of male offspring.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals and feeding procedures

The experimental protocol was approved by the Research Ethics Committee and Animal Care and Use Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (protocol no.2008221). All animals were housed in plastic cages (five rats/cage) in a

12h light-dark cycle at 24-26 °C. The animals were housed on shavings and had *ad libitum* access to standard rat chow and water. A total of 50 female Wistar rats aged 3 weeks were randomly allocated into two experimental groups: (1) a control chow diet and water and (2) a control chow diet and water plus cafeteria diet. The foods included in the cafeteria diet are described on Table 1. Foods were provided in excessive amounts and changed daily, to maintain variety, by replacing four of the foods by new items. Soft drink was provided daily. Hence, the animals did not receive the same foods for more than two consecutive days at a time. Animals were weighted once a week. After 10 weeks, vaginal smear was daily collected and observed in an optical microscope to assess stage of the oestrous cycle. Breeding was accomplished by housing a female overnight with a sexually experienced male on a proestrous night. Mating was confirmed by the presence of sperm in a vaginal smear the following morning at which time pregnant females from the two initial groups were subdivided into four groups: (1) a pre-gestation control chow diet group kept feeding chow diet during pregnancy and lactation (CON-CON n=12); (2) a pre-gestation control chow diet group changed to CAF from day 1 of pregnancy to pups weaning (CON-CAF n=12); (3) a pre-gestation CAF group kept feeding CAF during pregnancy and lactation (CAF-CAF n=12) and (4) a pre-gestation CAF group changed to control chow diet from day 1 of pregnancy to pups weaning (CAF-CON n=11). The experimental design is shown in Fig. 1. Approximately 5 days before delivery, pregnant females were individually housed and the presence of pups was checked twice a day. During pregnancy, females were weighted on alternated days. On the day of birth (Day 1), the number of pups was randomly culled into eight per dam. Females that had their litters with fewer than eight pups were excluded from the experiment. Soon after standardization, the litters were weighed and remained without intervention until the 10<sup>th</sup> when they were weighed again.

After the pups weaning, 2 male pups from each litter were weighed and divided according to their original group and allocated in acrylic boxes containing 5 animals per cage. The offspring of all groups were fed with water and standard chow, whose consumption was monitored every three days until 90 days of age.

### 2.3. Male Rat Sexual Behavior

At 90 days of age, male rats (virgin), offspring of female rats from different experimental groups (1 offspring/female) were submitted to the sexual behavior test, which was performed during dark cycle between 7:00 pm and 10:00 pm. They were removed from the home boxes and placed into a room attached to the animal laboratory, in acrylic observation boxes (70x70x35cm) to allow ample viewing and filming of the animals. They were kept in the boxes for 15 minutes for adaptation. After this period, a hormone-replaced OVX female rat was placed in the box and soon after that the record of behavior began, filmed with a digital camera for 20 minutes, and the latency to first mount, the frequency of mounts, the latency to the first intromission and the frequency of intromissions. It was computed as 1,200 second latency [28,29] when mount or intromission was not observed within 20 minutes (frequency equal to zero).

### 2.4. Blood sampling and body fat content

At 22 days post-partum and after 10-12h of fasting, the dams were decapitated by a guillotine. Blood was collected in previously heparinised tubes and centrifugated at 1500g for 10 min. After centrifugation, plasma was separated into aliquots and stored at – 80°C until biochemical analysis was performed. Adipose

tissue were removed and weighted immediately after decapitation. The same protocol was applied to the offspring the day after the sexual behavior test.

#### 2.5. Plasma analyses

Plasma concentrations of insulin, leptin and testosterone were measured in duplicate by ELISA using commercially available rat-specific ELISA kits (Millipore™, Billerica, USA, sensitivity 0.2 – 10 ng/mL; Enzo Life Sciences™; Plymouth Meeting, USA, limit of detection 67.2 pg/mL and USCN – USA – limit of detection 617.3 pg/mL, respectively). For the measurement of glucose, total cholesterol and triglycerides concentrations in plasma it was used the colorimetric method with commercial kits, (Labtest™, Brasil) with minimum detection sensitivity of 0.32mg/dL (glucose); 1.04 md/dL (total cholesterol) and 3.0mg/dL (triglycerides).

#### 2.6. Radioimmunoassay

Plasma concentrations of LH, FSH and prolactin were measured by Double antibody RIE, with specific and standard antibodies obtained from the National Program of Pituitary Hormone, National Institute of Health (Torrance, California, USA). The secondary antibody for the precipitation of RIE reaction is produced in sheep by the laboratory of Dr. Celso Rodrigues Franci (FMRP-USP). LH, FSH and prolactin were iodinated and purified. The minimal detectable doses were: 0,2 ng/mL (LH); 0,2 ng/mL (FSH) and 0,09 ng/mL (PRL). The intra assay variation coefficients were 4%, 3% and 3.5% for LH, FSH and PRL, respectively.

#### 2.7. Statistical analysis

The body weight gain of rats in pre-pregnancy and pregnancy periods was analyzed using two-way ANOVA for repeated measures (factors: group and time) followed by Bonferroni's test for multiple comparisons. Body weight, abdominal fat, plasma concentrations of insulin, leptin, TG, total cholesterol, glucose, LH, FSH and PRL of female rats and offspring of 4 different groups were analyzed using one-way ANOVA followed by Student Newman-Keuls test. Sexual behavior data was analyzed by the nonparametric Kruskal-Wallis test followed by the Dunn's multiple range test for the comparison of the groups. The percentage of animals exhibited intrusion behavior was analyzed using chi-square test and data were expressed as percentage of animals in each group. All data are expressed as mean  $\pm$  SEM, except for the latency and frequency of mounting behavior data (sexual behavior) for which the median (interquartile interval) was used. In all cases, the significance level was set at  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1 Mothers

After 10 weeks, the female rats fed with CAF presented increased body weight compared to CON group [ $t(48) = 3,42, P = 0,001$ ] (Fig 2A). The weight gain during pregnancy (Fig 2B) shows the effect of the pregnancy time [ $F(7,245) = 576,42; P < 0,0001$ ], and effect of the diet given during pregnancy [ $F(3,245) = 2,896; P = 0,04$ ] and the interaction between the factors time and diet received [ $F(21,245) = 13,52; P < 0,0001$ ]. From the day 12 of pregnancy, the CAF/CAF group had an increase in body weight gain as compared to the PAD/PAD group and this increase was maintained until the end of pregnancy ( $P < 0,05$ ). From the day 15 of pregnancy, PAD/CAF the group presented body weight increase compared to PAD/PAD group, being this increase maintained until the end of pregnancy ( $P < 0,05$ ).

Table 2 shows that at the weaning of the pups, the female rats of CON/CAF and CAF/CAF groups exhibited increase in body weight [F(3,41)= 5,77; P=0,002] and abdominal fat [F(3,41)= 12,06; P<0,0001] compared to other groups. The female rats of CON/CAF and CAF/CAF groups exhibited increase in insulin [F(3,33)= 11,71; P<0.0001], leptin [F(3,33)= 12,50; P<0,0001] and TG content [F(3,35)= 3,88; P=0,001] when compared to the other groups. There were no significant differences in concentrations of cholesterol and triglycerides (P>0.05).

### 3.2. Offspring

Table 3 shows that on the first day of life, body weight of litters of CAF/CAF and CON/CAF groups was higher when compared to the CON/CON and CAF/CON groups [F(3,39)= 6.09; P=0.001] and at weaning, this difference remained [F(3,39)= 28.6 ; P<0.0001]. However, the body weight differences disappeared during the development (data not shown) so that on the 90<sup>th</sup> day, there were no significant differences of body weight between the groups (P>0.05). Also, it was not observed significant differences in the consumption of standard chow between the different groups (P>0.05). Offspring of female rats of CAF/CAF group showed significant increase in abdominal fat F(3,39)= 7.44; P=0.0005], insulin [F(3,38)= 4.44; P=0.009] and leptin contents[F(3,32)= 3.9; P=0.01] when compared to the other groups. Offspring of CON/CAF group showed increased abdominal fat content and insulin, but not so significantly as the offspring of CAF/CAF groups. Offspring of female rats of CON/CAF and CAF/CAF groups showed increase in plasma concentrations of triglycerides [F(3,38)= 7.05; P=0.0004] compared to CON/CON and CAF/CON groups, but there were not significant differences in plasma concentrations of total cholesterol and glucose between the different groups (P<0.05) .

### 3.3. Male Reproductive Hormones

Fig. 3 shows the effects of maternal diet on plasma concentrations of LH, FSH, testosterone and PRL of their offspring as adults. The offspring of female rats of CON/CAF, CAF/CAF and CAF/CON groups exhibited decreases in plasma concentration of testosterone [F(3,36)= 3.45; P=0.002], LH [F(3,37) = 3,94, P= 0.03] and FSH [F(3,38)= 10,13; P= 0.0002] compared to offspring of female rats of CON/CON group, with no changes in plasma concentrations of PRL (P>0.05).

### 3.4. Male Sexual Behavior

Fig. 4 shows the effects of maternal diet on the different evaluated parameters of sexual behavior. The Kruskal-Wallis test did not indicate significant difference in the median latency to mounts (P= 0.05) and for the frequency of mounts (P=0.62). However, the offspring of female rats from CON/CAF, CAF/CAF and CAF/CON groups showed reduction in the percentage of animals displaying intrusion behavior (20%, 40%, and 25% respectively, compared to the offspring of the CON group that showed 100%) (Fig. 4D), and the Kruskal-Wallis test indicated a significant difference in the medians for the frequency of intrusions of the CON/CAF, CAF/CAF and CAF/CON groups, when compared to PAD/PAD (P=0002) group (data shown as mean ± SEM).

## 4. Discussion

Our results show that the cafeteria diet being administered since weaning is an experimental model capable of inducing obesity, besides endocrine and metabolic

modifications. Specifically, female rats fed with cafeteria diet showed increase in body weight at the end of 10 weeks [30, 31]. It was noted that the elapsed time from weaning until the end of lactation the female rats of the CAF/CAF group presented body weight and abdominal fat increase in association with increased insulin, leptin and triglyceride plasma concentrations [30,32,33]. Moreover, it was shown that the administration of cafeteria diet for a shorter period, equivalent to the pregnancy and lactation period (CON/CAF group) also resulted in a considerable impact on increased body weight and abdominal fat content associated to a significant increase on plasma insulin and leptin content. On the contrary, the female rats that had the administration of cafeteria diet suspended from the first day of pregnancy (CAF/CON group), presented body weight, abdominal fat content and plasma concentrations of insulin and leptin similar to the control group (CON/CON) indicating that the mere interruption of cafeteria diet consumption may reverse its adverse metabolic effects within some weeks [34].

Analyzing offspring, it was observed that the offspring of female rats of CAF/CAF and CON/CAF groups exhibited increased body weight at birth when compared to the other groups. These data point to the influence of maternal diet during pregnancy for the determination of a high weight at birth, corroborating “fetal overnutrition hypothesis” suggested by Nivoit and coworkers (2009) [21]. At weaning, body weight was still significantly superior to the other groups. However, these differences disappeared during development, so that in adulthood, there was no difference in body weight between the groups. These findings may indicate an important influence of breastfeeding on the weight gain during the first days of life, since breast milk is the sole food of the newborn [35] and that obese female rats present an increase in fat, protein and raw caloric content, decrease of water content, with no difference in the content of sugars [36]. Also, in our obesity model, the soft drink consumption may have positively influenced the content of sugars of breast milk. However, as it was not offered cafeteria diet to the offspring, body weight gain was avoided during its development. At this point, we suggest that in addition to the influences of diet and maternal obesity, the body weight gain in the offspring would depend on a caloric overload during development.

Although offspring were not phenotypically obese, offspring of female rats of CAF/CAF and CON/CAF groups exhibited increased abdominal fat content in association with higher levels of insulin triglycerides when compared to the other groups. Such modifications were more evident in the offspring of female rats of CAF/CAF group, as well as these animals showed increase in plasma concentrations of leptin. Interestingly, it was not observed differences in the consumption of standard chow of these animals. In this regard, it should be considered that the beginning of pregnancy in female rats of CAF/CAF group could be characterized by a physiological state already altered (due to the weight increase), having influence on the fetal development from conception.

Despite an important acute effect of CAF administration having been observed from the beginning of pregnancy + lactation (PAD/CAF group) on the metabolic outcomes of mothers, such effects apparently did not represent such a significant impact on the offspring as to most of the long-term evaluated parameters, indicating that the conditions of the intrauterine and/or neonatal environment are not exclusive determinants for the development of obesity and metabolic syndrome of the offspring, at least in this animal model.

Thus, it is clear the relevance of reproduction time and period in which the cafeteria diet is administered as an essential condition for establishing long-term

alterations on the offspring, that is, the magnitude of the impact produced on the offspring is, in some aspects, proportional to the time mother ingested such diet. However, this observation seems not to be valid as to reproductive function. The aims of the sexual behavior test developed with the offspring were: to investigate the effects of obesity and metabolic alterations on the reproductive parameters of male rats and whether the impairment of the reproductive function would be related to early changes such as variations in the intrauterine changes due to maternal food intake.

Surprisingly, the offspring of all the female rats to which cafeteria diet was administered, independent of the time and period in which it was offered (CON/CAF, CAF/CAF and CAF/COM groups) presented behavioral changes characterized by the reduction of both intrusion behavior and frequency.

In association with these findings, all groups presented reductions in the concentrations of LH, FSH, and testosterone when compared to offspring of the control group. Interestingly, those reductions were in the same magnitude in all groups. Thus, in this case, we cannot attribute the endocrine and metabolic alterations associated with the increase in adiposity as the only determinant of fertility disorders, as described in different works [24, 37], because there was a significant increase in abdominal fat only in the offspring of CAF/CAF group.

The testosterone reduction in the offspring of the different groups may indicate that the maternal metabolic state both in conception and during the fetal development may influence the gonadal development and/or steroidogenesis. It was also found a reduction in LH and FSH plasma concentrations, indicating a failure on the negative feedback loop, characteristic of this system of hormone regulation [38]. This finding may suggest a possible central defect in the regulation of reproductive axis.

The maternal insulin, possibly increased both during the early embryonic stages (CAF/PAD group) and in more advanced stages of fetal development (PAD/CAF group) could potentially explain this phenomenon. This increase could produce downregulation of central insulin receptors, specifically in GnRH neurons of embryos/fetuses. The development of hypothalamic cell culture served as a tool to observe that neurons expressing GnRH, also express insulin receptors and that insulin induces the fast stimulation of GnRH expression through stimulation of c-fos and EGR-1 genes [39]. Mice with deletion of 95% of central receptors for insulin present, among other effects, fertility disorders due to the reduction of LH secretion [40]. To test the integrity of the pituitary functionality of these animals, Brunning and collaborators (2000) administered intraperitoneal injection of Lupron (GnRH agonist). That datum appoints to the importance of integrity of central receptors of insulin for the hypothalamic-pituitary-gonadal axis regulation. Although PRL participates of the reproductive process in male rats [41, 42], the PRL concentration in plasma was not modified between the groups, indicating that the maternal diet seems not to interfere in the synthesis and release of this hormone, or, the maternal diet does not influence the maturation of lactotrophs and PRL releasing regulatory systems, differently of what seems to occur in other brain areas involved in the reproduction control, as discussed. Thus, the reproductive modifications previously observed does not establish relationships with modification in PRL regulation.

## 5. Conclusions

More studies are required to investigate the origin of modifications in the reproductive function, presented in this study. However, these findings demonstrate

that the maternal consumption of cafeteria diet may affect the offspring secretion of reproductive hormones regardless of the time of administration and the period of reproduction to which the mother was exposed to the diet, and may indicate that the regulation and development of reproductive endocrine axis is considerably more sensible to the effects of maternal diet compared to other physiological systems, such as the regulation systems of energy balance. Still, we shall consider that during embryogenesis, the CNS is one of the first systems to be formed and is extremely dependent on the environmental conditions[43] (Moore, 2008) and that the integrity of hypothalamic-pituitary-gonadal (HPG) axis has a very important role in the reproductive system as well as in sexual behavior.

#### Acknowledgments

This study was supported by grants from the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq). We appreciate the assistance of UFRGS.

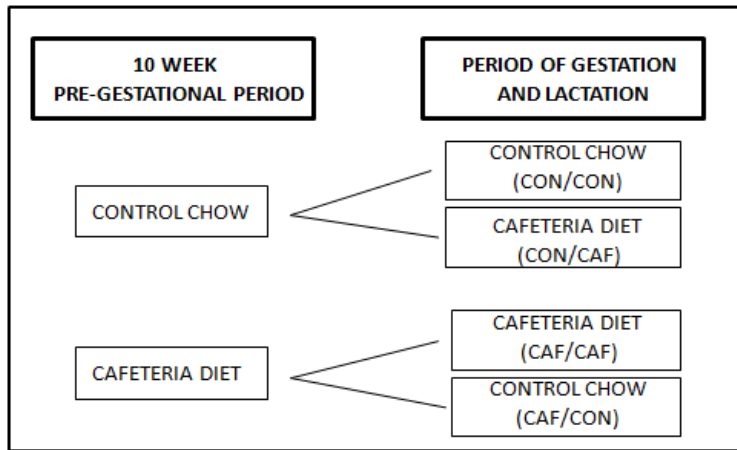
#### References

- [1] White CL, Pistell PJ, Purpera MN, Gupta S, Hise TL, Keller JN, Ingram DK, Morrison CD. NIH Public Access. *Biomed Res* 2010; 35(1): 3-13.
- [2] Ogden CL, Yanovski S Z, Carroll MD, Flegal KM. The epidemiology of obesity. *Gastroenterology* 2007; 132(6): 2087-102.
- [3] Nathan BM, Moran A. Metabolic complications of obesity in childhood and adolescence: more than just diabetes. *Cur Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008; 15:21-9.
- [4] Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, Lamb MM, Flegal KM Prevalence of High BodyMass Index in US Children and Adolescents, 2007–2008. *JAMA* 2010; 303:242–9.
- [5] Eckel RH, Grund SM, Zimmet PZ. The methabolic syndrome. *Lancet* 2005; 365:1415-28.
- [6] McMillen IC, Adam CL, Muhlhauser BS. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J Physiol* 2005; 565: 9-17.
- [7] Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity on mammals. *Exp Physiol* 2007; 92: 287-98.
- [8] Grundy SM. Metabolic syndrome pandemic. *Atheroscler Thrombos Vasc Biol* 2008; 28; 629-36.
- [9] Blair NJ, Thompson JM, Black PN. Risk Factors for obesity in 7-year-old European children: Auckland Birth-weight Collaborative Study. *Arch Dis Child* 2007; 92: 866-71.
- [10] Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005; 115(3): 290–6.
- [11] Swell MF, Houston-Presley L, Super DM, Catalano P. Increased neonatal fat mass, not lean body mass, is associated with maternal obesity. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195(4):1100–3.
- [12] Hull HR, Dinger MK, Knehans AW, Thompson DM, Fields DA. Impact of maternal body mass index on neonate birthweight and body composition. *Am J Obstet Gynecol* 2008; 98(4):416.
- [13] Hillier TA, Pedula KL, Schmidt MM, Mullen JA, Ccharles MA, Pettitt DJ. Childhood obesity and metabolic imprinting: the ongoing effects of maternal hyperglycemia. *Diab Care* 2007; 30(9):2287–92.

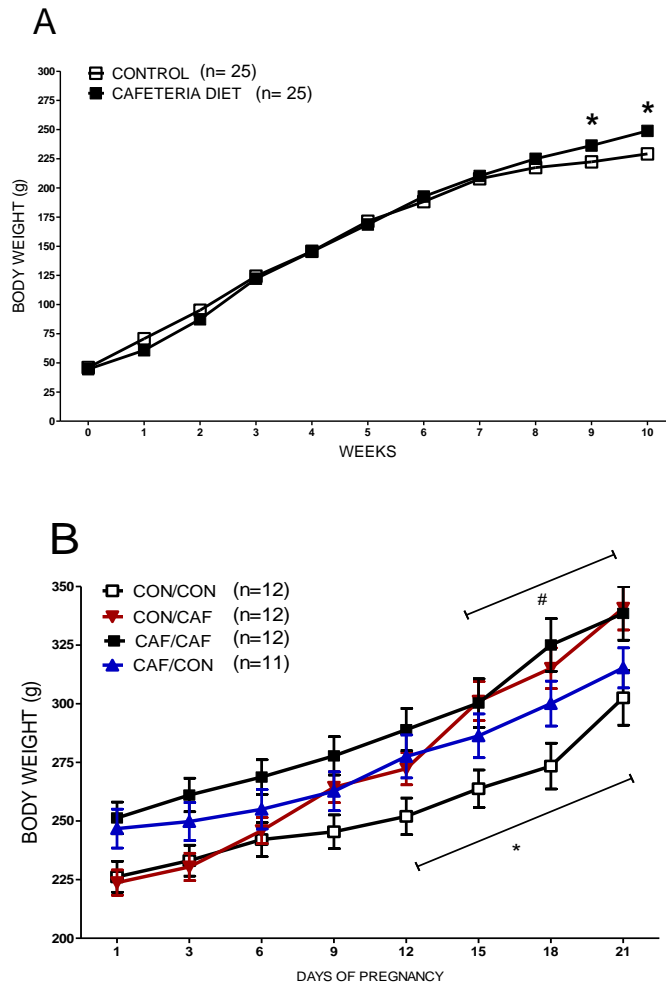
- [14] Dietz WH. Critical periods in childhood for the development of obesity. *Am J Clin Nutr* 1994; 59(5):955-94.
- [15] Martins MR, Vieira AK, de Souza EP, Moura AS. Early overnutrition impairs insulin signaling in the heart of adult Swiss mice. *J Endocrinol* 2008; 198(3):591-8.
- [16] Barker DJ. Fetal programming of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13:65-74.
- [17] Parsons TJ, Power C, Manor O. Fetal and early life growth and body mass index from birth to early adulthood in 1958 British cohort: longitudinal study. *BMJ* 2001; 323:1331-5.
- [18] Guo F, Jen KL. High-fat feeding during pregnancy and lactation affects offspring metabolism in rats. *Physiol Behav* 1995; 57: 681-6.
- [19] Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy-rich diet during development. *J Physiol* 2005; 565: 3-8.
- [20] Férézou-Viala J, Roy AF, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, Gertler A, Delplanque B, Dijane J, Riottot M, Taouis M. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *Am J Regul Integr Comp Physiol* 2007; 293: R1056-R1062.
- [21] Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, Reusens B. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia* 2009; 52(6):1133-42.
- [22] MacDonald AA, Herbinson GP, Showell M, Farquhar CM. The impact of body mass index on semen parameters and reproductive hormones in human males: a systematic review with meta-analysis. *Hum Reprod Update* 2010; 16(3):293-311.
- [23] Teerds KJ, de Rooji DG, Keijzer J. Functional relationship between obesity and male reproduction: from humans to animal models. *Hum Reprod Update* 2011; 17(5):667-83.
- [24] Palmer NO, Fullston T, Mitchell M, Setchell BP, Lane M. Sirt6 in mouse spermatogenesis is modulated by diet-induced obesity. *Reprod Fert Development* 2012; 23(7):929-39.
- [25] Foresta C, Di MA, Pagano C. Insulin-like factor 3 as a marker of testicular function in obese man. *Clin Endocrinol* 2009; 71(5):722-6.
- [26] Chughtai B, Lee RK, Te AE. Metabolic syndrome and sexual dysfunction. *Curr Opin Urol* 2011; 21(6):514-18.
- [27] Pavlovich CP, King P, Goldstein M. Evidence of a treatable endocrineopathy in infertile men. *J Urol* 2001; 165 (3): 837-41.
- [28] Breigeron MK, Morris M, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of angiotensin II microinjected into medial amygdala on male sexual behavior in rats. *Horm Behav* 2002; 41: 267-74.
- [29] Breigeron MK, Lucion AB, Sanvitto GL. Effects of renovascular hypertension on reproductive in male rats. *Life Sciences* 2007; 80:1627-34.
- [30] Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freerman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Makowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity* 2011; 19(6): 1109-17.
- [31] Sagae SC, Menezes EF, Bonfleur ML, Venzela EC, Zacharias P, Lubaczewski C, Franci CR, Sanvitto GL. Early onset of obesity induces reproductive deficits on female rats. *Physiol Behav* 2012; 105: 1104-11.



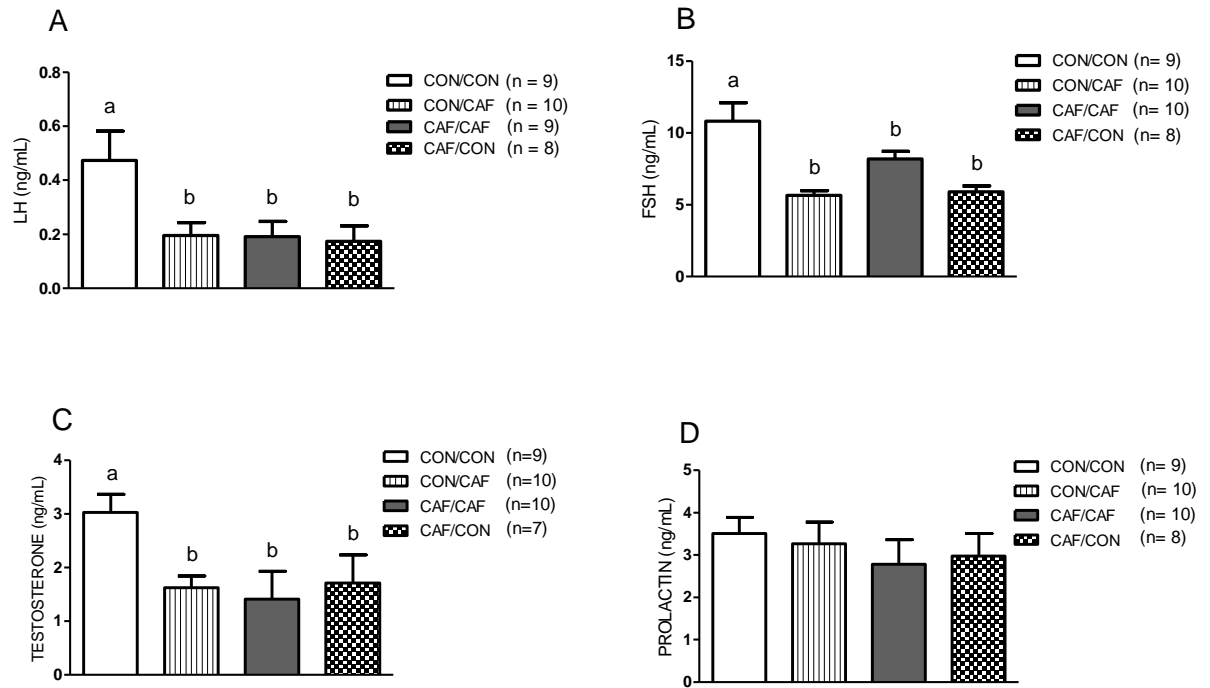
- [32] Prada PO, Zecchin HG, Gasparetti AL, Torsoni MA, Bueno M, Hirata AE, Aamaral MEC, Höer NF, Boschero AC, Saad MJA. Western diet modulates insulin signaling, c-Jun N-terminal kinase activity, and insulin receptor substrate-1 phosphorylation in a tissue-specific fashion. *Endocrinology* 2005; 146:1576-87.
- [33] Kretschmer BD, Scheling P, Beier N, Liebcher C, Treutel S, Krüger N, Scholz H, Haus A. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sciences* 2005; 76:1553-73.
- [34] Goularte JF, Ferreira MBC, Sanvitto GL. Effects of food pattern change and physical exercise on cafeteria diet-induced obesity in female rats. *Br J Nutr* 2012; 108(8), 1511-18.
- [35] Drewett RF, Staham C, Wakerley JB. A quantitative analysis of the feeding behavior of suckling rats. *Anim Behav* 1974; 22: 907.
- [36] Rolls BA, Gurr MI. Lactations in lean and obese rats: Effect of cafeteria diet feeding and dietary obesity and milk composition. *Physiol Behav* 1986; 38: 185-90.
- [37] Michalakis K, Mintziori G, Kaprara A, Tarlatzis BC, Goulis D. The complex interaction between obesity, metabolic syndrome and reproductive axis: A narrative review. *Metabolism* 2013; 62: 457-78.
- [38] Ganong WF. Blood, pituitary, and brain rennin-angiotensin system and regulation of secretion of anterior pituitary gland. *Front Neuroendocrinol* 1993; 14(3):223-49.
- [39] Salvi R, Castillo E, Voirol MJ, Glauser M, Rey JP, Gaillard RC, Vollenweider P, Pralong FP. Gonadotropin-releasing hormone expressing neurons immortalized conditionally are activated by insulin: implication of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2006; 147:816–26.
- [40] Brünnig JC, Gautm D, Burks DJ, Gillete J, Schubert M, Oorban PC, Klein R, Krone W, Müller-Wieland D, Kahn CR. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Endocrinology* 2000; 289(5487):2122-5.
- [41] Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000; 80(4):1523-631.
- [42] Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR. Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology* 2011; 152(2):526-35.
- [43] Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia básica*. 7<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- [44] Naftolin F. Understanding the bases of sex differences. *Science* 1981, 211: 4488.
- [45] Nelson RJ. Male Reproductive Behavior. In: *An Introduction to Behavior Endocrinology*. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts, USA, 1995.



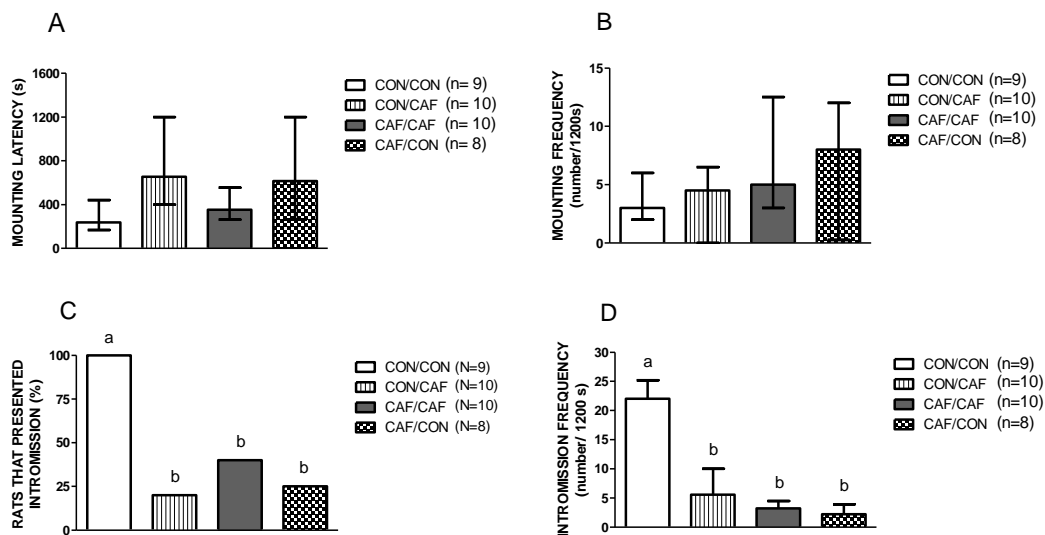
**Fig. 1.** Schematic diagram of the experimental groups. Groups CONTROL and CAFETERIA were subdivided from day 1 of pregnancy until pup's weaning into the four groups: CON-CON, CON-CAF, CAF-CAF and CAF-CON groups.



**Fig. 2. A** – Weight gain of control and cafeteria groups \* $p < 0,05$ ; **B** – Body weight gain during gestation in CON/CON, CON/CAF, CAF/CAF and CAF/CON groups. \* CON/CON versus CAF/CAF ( $p < 0,05$ ); # CON/CON versus CON/CAF ( $P < 0,05$ ). All values are expressed as the means  $\pm$  SEM.



**Fig. 3:** Plasma LH (A), FSH (B), testosterone (C) and prolactin (D) of adult male offspring of female rats from CON/CON, CON/CAF, CAF/CAF and CAF/CON grupos. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). All values are expressed as the means  $\pm$  SEM.



**Fig. 4:** Sexual behavior of adult male offspring of female rats from CON/CON, CON/CAF, CAF/CAF and CAF/COM groups. **A:** Mounting latency (s); **B:** Mounting frequency ( $n^\circ/1200s$ ) (data expressed as the median and interquartile); **C:** The percentage of animals that exhibited intromission (%) and **D:** Intromission frequency ( $n^\circ/1200s$ ) (data expressed as the means  $\pm$  SEM). Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ).

**Table 1.** Food available to the animals in the cafeteria diet.

	Energy (KJ/100g)	Carbohydrates (g/100g)	Protein (g/100g)	Fat (g/100g)
Chow (NutriLab CR-1, Brazil)	1234	55	22	4
Salami (Majestade, Brazil)	1414	0	32	24
Bread Seven Boys (Seven Boys, Brazil)	1234	53	9	4
Snack Yokitos (Yoki, Brazil)	2008	60	6	24
Deliket Jelly Bean (Dori Alimentos, Brazil)	1590	95	0	0
Coca-Cola (Coca-Cola, Brazil)	178	11	0	0
Smoked sausage (Perdigão, Brazil)	1331	1	32	32
Chocolate cake (Nutrella, Brazil)	1360	50	12	12
Biscuit Maisena (Isabela, Brazil)	1799	73	12	12
Marshmallow (Fini, Brazil)	1423	80	0	0
Ham (Sadia, Brazil)	649	0	9	9
Snack Fritello (Pavioli, Brazil)	2125	52	29	29
Wafer Biscuit Chocolate (Bauducco, Brazil)	2176	63	27	27
Gumdrop Gomets (Dori Alimentos, Brazil)	1506	90	0	0

**Tabela 2:** Body weight, abdominal fat content and plasma concentrations of insulin, leptin, total cholesterol, glucose and triglicerides of female rats of the CON/CON, CON/CAF, CAF/CAF and CAF/CON groups. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). All values are expressed as the means  $\pm$  SEM.

Groups	CON/CON	CON/CAF	CAF/CAF	CAF/CON	P
Body weight (g)	256.8 $\pm$ 3.7 <sup>a</sup> (n=10)	276.7 $\pm$ 5.3 <sup>b</sup> (n=12)	275.5 $\pm$ 3.5 <sup>b</sup> (n=10)	252.4 $\pm$ 7.5 <sup>a</sup> (n=10)	0.002
Abdominal fat (g)	4.64 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup> (n=10)	9.52 $\pm$ 0.85 <sup>b</sup> (n=12)	8.47 $\pm$ 0.69 <sup>b</sup> (n=10)	5.33 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> (n=10)	<0.0001
Insulin (ng/mL)	2.74 $\pm$ 0.51 <sup>a</sup> (n=8)	6.96 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup> (n=9)	5.19 $\pm$ 0.59 <sup>c</sup> (n=7)	3.13 $\pm$ 0.55 <sup>a</sup> (n=10)	<0.0001
Leptin (pg/mL)	154.4 $\pm$ 13.9 <sup>a</sup> (n=8)	313.6 $\pm$ 32.8 <sup>b</sup> (n=6)	253.4 $\pm$ 18.5 <sup>b</sup> (n=7)	137 $\pm$ 14.5 <sup>a</sup> (n=10)	<0.0001
Total cholesterol (mg/dL)	60.2 $\pm$ 8.5 (n=8)	75.21 $\pm$ 6.9 (n=9)	76 $\pm$ 4.2 (n=10)	78.7 $\pm$ 5.9 (n=10)	0.21
Glucose (mg/dL)	100.6 $\pm$ 5.1 (n=9)	108.1 $\pm$ 5.2 (n=11)	112.2 $\pm$ 3 (n=9)	97.4 $\pm$ 5.7 (n=10)	0.16
Triglicerides (mg/dL)	75.36 $\pm$ 4.6 <sup>a</sup> (n=8)	87.42 $\pm$ 10.1 <sup>ab</sup> (n=9)	108.3 $\pm$ 7.6 <sup>b</sup> (n=9)	78.75 $\pm$ 5.9 <sup>a</sup> (n=10)	0.01

**Tabela 3:** Litter weight at birth, individual body weight at weaning and adulthood. Standard chow intake, abdominal fat content, plasma concentrations of insulin, leptin, total cholesterol total, glucose and triglicerides of the offspring of female rats from CON/CON, CON/CAF, CAF/CAF and CAF/CON groups. Different letters indicate significant differences between groups ( $P < 0.05$ ). All values are expressed as the means  $\pm$  SEM.

Groups	CON/CON	CON/CAF	CAF/CAF	CAF/CON	P
Litter weight at birth (g)	50.7 $\pm$ 1.2 <sup>a</sup> (n=10)	56.3 $\pm$ 1.4 <sup>b</sup> (n=10)	55.6 $\pm$ 0.5 <sup>b</sup> (n=10)	51.8 $\pm$ 0.9 <sup>a</sup> (n=10)	0.001
Body weight at weaning (g)	36.8 $\pm$ 1 <sup>a</sup> (n=10)	52.9 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup> (n=10)	52.5 $\pm$ 1.2 <sup>b</sup> (n=10)	40.8 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup> (n=10)	<0.0001
Adult body weight (g)	313.1 $\pm$ 7.7 (n=10)	296.7 $\pm$ 4.7 (n=10)	326.7 $\pm$ 10 (n=10)	294.8 $\pm$ 13.5 (n=10)	0.07
Standard chow intake (g)	1568 $\pm$ 3.8 (n= 10)	1521 $\pm$ 21.4 (n=10)	1568 $\pm$ 10.4 (n+10)	1539 $\pm$ 29.9 (n=10)	0.24
Abdominal fat (g)	9.2 $\pm$ 0.8 <sup>a</sup> (n=10)	11.2 $\pm$ 0.5 <sup>ab</sup> (n=10)	13.7 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup> (n=10)	8.2 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> (n=10)	0.0005
Insulin (ng/mL)	3.9 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup> (n=10)	4.8 $\pm$ 0.6 <sup>ab</sup> (n=10)	7 $\pm$ 0.8 <sup>b</sup> (n=9)	3.4 $\pm$ 0.7 <sup>a</sup> (n=10)	0.009
Leptin (pg/mL)	133,6 $\pm$ 20.1 <sup>a</sup> (n=10)	118 $\pm$ 6.9 <sup>a</sup> (n=6)	223.2 $\pm$ 30.8 <sup>b</sup> (n=10)	111.7 $\pm$ 36.4 <sup>a</sup> (n=7)	0,01
Total cholesterol (mg/dL)	75.5 $\pm$ 3.9 (n=10)	91.6 $\pm$ 12.7 (n=8)	83.3 $\pm$ 8.5 (n=10)	88 $\pm$ 5.8 (n=10)	0.52
Glucose (mg/dL)	117 $\pm$ 11.6 (n=10)	100.4 $\pm$ 3 (n=10)	107.7 $\pm$ 7.9 (n=10)	91.1 $\pm$ 4.8 (n=10)	0.11
Triglicerides (mg/dL)	62.9 $\pm$ 6 <sup>a</sup> (n=10)	95.4 $\pm$ 5.7 <sup>b</sup> (n=10)	90.2 $\pm$ 6.4 <sup>b</sup> (n=9)	58 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup> (n=10)	0.0004