

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

Mariana Fraga Gauthier

**Efeito da dieta materna sobre o
estresse oxidativo e a expressão
gênica dos receptores de prolactina
e de estrógeno alfa no tecido
adiposo e no hipotálamo da prole de
camundongos.**

**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2019**

Mariana Fraga Gauthier

Efeito da dieta materna sobre o estresse oxidativo e a expressão gênica dos receptores de prolactina e de estrógeno alfa no tecido adiposo e no hipotálamo da prole de camundongos.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biociências da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre

Orientador(a): Dr(a). Márcia Giovenardi
Coorientador(a): Dr(a). Silvana de Almeida

**Porto Alegre
2019**

Catálogo na Publicação

Fraga Gauthier, Mariana

Efeito da dieta materna sobre o estresse oxidativo e a expressão gênica dos receptores de prolactina e de estrógeno alfa no tecido adiposo e no hipotálamo da prole de camundongos. / Mariana Fraga Gauthier. -- 2019.

82 p. : il., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em BioCiências, 2019.

Orientador(a) : Márcia Giovenardi ; coorientador(a) : Silvana de Almeida.

1. Estresse oxidativo. 2. Metabolismo energético . 3. Dieta materna. 4. Restrição calórica. 5. Dieta hipercalórica. I. Título.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), e contou com recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS).

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe Agnesis, pelo amor incondicional. Obrigada pela dedicação, amizade, por sempre acreditar no meu potencial e vibrar a cada conquista. Saiba que teu alto astral são “pílulas incentivadoras” no meu dia a dia. Te amo muito! Sou muito grata e abençoada por ser tua filha.

À minha avó Anita (*in memoriam*), meu exemplo de fé, perseverança e resiliência. Teus ensinamentos estarão sempre comigo, vó Anita!

Às queridas orientadoras Márcia e Silvana, muito obrigada pela oportunidade de realizar esse trabalho, vocês são professoras e pesquisadoras incríveis.

Às professoras Marilene e Renata, pelo auxílio científico.

Aos colegas/amigos do grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica pela parceria na realização dos experimentos, pelas trocas de ideias científicas e também pelos divertidos momentos de descontração, vocês certamente deixaram meus dias mais felizes durante essa jornada acadêmica!

SUMÁRIO

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS	4
AGRADECIMENTOS	5
LISTA DE ABREVIATURAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	13
1.1. DIETA MATERNA NA GESTAÇÃO	13
1.2. PROLACTINA E SEU RECEPTOR	16
1.3. VIAS DE SINALIZAÇÃO DA PROLACTINA NO TECIDO ADIPOSEO	18
1.4. HIPOTÁLAMO, PROLACTINA E REGULAÇÃO DO METABOLISMO ENERGÉTICO	21
1.5. RECEPTOR DE ESTRÓGENO ALFA	24
1.6. ESTRESSE OXIDATIVO	25
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. ARTIGO CIENTÍFICO	28
4. DISCUSSÃO	62
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
7. ANEXOS	74
8. CURRÍCULO LATTES	79

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL: Ácidos graxos livres

CAT: Catalase

D2R: Receptor de dopamina subtipo D2R

ESR1: Receptor de estrógeno alfa (humanos)

Esr1: Receptor de estrógeno alfa (camundongos)

FAS: Ácido graxo sintase

JAK: Janus Kinase

LPL: Lipoproteína lipase

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

PRL: Prolactina

PRLR: Receptor de prolactina (humanos)

Prlr: Receptor de prolactina (camundongos)

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SOD: Superóxido dismutase

STAT: Transdutor de sinal e ativador de transcrição

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Interações complexas entre o ambiente materno, placentário e fetal durante o período gestacional14
- Figura 2 – Ações metabólicas da prolactina na composição corporal, pâncreas, próstata, mama e tecido adiposo 18
- Figura 3 – Esquema representando as vias de sinalização da prolactina no tecido adiposo..... 19
- Figura 4 – Efeito metabólico da prolactina no tecido..... 21
- Figura 5 – Núcleos hipotalâmicos que participam da regulação do balanço energético e peso corporal 22

RESUMO

INTRODUÇÃO: O estado nutricional da genitora durante a gestação e a lactação tem suma importância não só no desenvolvimento fetal como também no perfil metabólico desse animal na vida adulta. A exposição ambiental da mãe pode contribuir para a promoção da reprogramação fetal, repercutindo de alguma forma na prole quando adulta. A proposta de avaliar os efeitos da nutrição materna (hipercalórica ou restrição calórica), bem como a dieta que a prole recebe após o desmame na expressão gênica dos receptores de prolactina (*Prlr*) e de estrógeno alfa (*Esr1*) no tecido adiposo e no hipotálamo de genitoras e camundongos machos é pioneira. **OBJETIVOS:** Avaliar o perfil metabólico em camundongos fêmeas, parâmetros de estresse oxidativo no tecido adiposo e a expressão gênica dos receptores de prolactina (*Prlr*) e de estrógeno alfa (*Esr1*) no tecido adiposo e no hipotálamo das genitoras e de seus filhotes machos que receberam dieta controle (CONT), restrição calórica (RD) ou hipercalórica (HD). **METODOLOGIA:** As mães foram alimentadas com sua respectiva dieta durante o acasalamento, gestação e lactação, e os filhotes após o desmame. Os grupos experimentais foram abreviados de acordo com as dietas materna em CONT, RD ou HD e dietas maternas/prole: CONT/CONT, CONT/RD, CONT/HD, RD/CONT, RD/RD, RD/HD, HD/CONT, HD/RD, HD/HD. O perfil lipídico, glicose, insulina e concentração sérica de leptina foram analisados por ELISA, seguindo as instruções do kit, somente nas genitoras. A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), as atividades das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) foram analisadas no tecido adiposo das fêmeas e na prole machos. A análise da expressão gênica relativa dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo e hipotálamo, foi feita através da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR) e calculados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. **RESULTADOS:** Encontramos um aumento significativo nos níveis de triglicerídeos, na concentração de leptina e diminuição na atividade da SOD das mães alimentadas com dieta HD. Mães RD apresentaram um aumento no tempo para engravidar. Também foi observado menor expressão do *Prlr* nos grupos de genitoras HD e RD no hipotálamo. Quando analisamos a prole, filhotes de mãe RD apresentaram menor ganho de

peso no período da lactação, também observamos efeito da dieta materna (dieta HD) no aumento de DCF nos grupos HD/CONT e HD/HD. Aumento da atividade da SOD nos grupos HD/CONT, HD/RD e HD/HD. Aumento da atividade da CAT no tecido adiposo do grupo HD/RD. A expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo da prole apresentou uma diminuição significativa no grupo RD/RD. No hipotálamo a expressão do *Prlr* na prole esteve diminuída significativamente no grupo RD/RD e RD/HD, a expressão do *Esr1* também esteve diminuída significativamente no grupo RD/HD. **CONCLUSÃO:** Observamos efeito da dieta materna na expressão dos receptores *Prlr* e *Esr1*, relacionados ao metabolismo energético, bem como no desbalanço do estresse oxidativo a nível hipotalâmico e periférico, impactando na saúde da prole na vida adulta.

PALAVRAS-CHAVE: estresse oxidativo, metabolismo energético, restrição calórica, dieta hipercalórica, hipotálamo, tecido adiposo.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The nutritional state of the dams during lactation and pregnancy is of great importance, not only in the fetal development, but also in the metabolic profile of these animals in adult life. Several studies have shown that the environmental exposure of the mother can contribute to the promotion of fetal reprogramming, affecting in some way the offspring as adults. The proposal to evaluate the effects of maternal nutrition (hypercaloric or caloric restriction), as well as the diet that the offspring received after weaning, on the gene expression of prolactin and estrogen alpha receptors in the adipose tissue and hypothalamus, of dams and their male offspring, is pionner. **OBJECTIVES:** Evaluate the metabolic profile in mice dams, parameters of oxidative stress in the adipose tissue, and gene expression of the prolactin (*Prlr*) and alpha estrogen (*Esr1*) receptors in the adipose tissue and hypothalamus, in dams and in their male offspring that received control (CONT), caloric restriction (RD), or hypercaloric diets (HD). **METHODOLOGY:** The mothers were fed their respective diet during mating, pregnancy and lactation, and the offspring received after weaning. Experimental groups names were abbreviated according to maternal diets: CONT, RD or HD and maternal/offspring diets: CONT/CONT, CONT/RD, CONT/HD, RD/CONT, RD/RD, RD/HD, HD/CONT, HD/RD, HD/HD. The lipid profile, glucose, insulin, and serum leptin concentration were analyzed by ELISA, following the kit instructions only in the dams. The reactive oxygen species (ROS) production and the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes were analyzed in the adipose tissue of dams and male offspring. The analysis of the *Prlr* and *Esr1* relative gene expression in the adipose tissue and hypothalamus was performed by Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qPCR), and calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **RESULTS:** We found a significant increase in triglycerides and leptin levels, and a decrease in the SOD activity in the mothers fed with a HD diet. RD dams showed an increase in time to get pregnant. It was also observed in the dams a lower expression of *Prlr* in the HD and RD groups in the hypothalamus. When we analyzed the offspring, pups of RD dams showed lower weight gain in the lactation period, we also observed the effect of the

maternal diet (HD diet) in the increase of DCF in the HD/CONT and HD/HD groups; increased SOD activity in the HD/CONT, HD/RD, and HD/HD groups; increase of CAT activity in the HD/RD group in the adipose tissue. The gene expression of the *Prlr* and *Esr1* receptors in the adipose tissue of the offspring showed a significant decrease in the RD/RD group. The *Prlr* expression in the offspring was significantly decreased in the RD/RD and RD/HD groups in the hypothalamus. The expression of *Esr1* also showed a significant decrease in the RD/HD group in the hypothalamus. **CONCLUSION:** We observed an effect of the maternal diet in the expression of *Prlr* and *Esr1* receptors, which are related to energy metabolism, as well as the disbalance of oxidative stress at hypothalamic and peripheral levels, impacting the health of the offspring in the adult life.

KEYWORDS: oxidative stress, energy metabolism, caloric restriction, hypercaloric diet, hypothalamus, adipose tissue.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dieta materna na gestação

O apetite e a ingestão de alimentos estão aumentados na gravidez, com isso, ocorre uma resposta adaptativa do organismo com a função de facilitar o armazenamento de energia para as altas demandas metabólicas do período gestacional e da lactação (Ladyman *et al.*, 2010). Caso a gestante apresente oferta energética inadequada, pode ocorrer limitação da disponibilidade dos nutrientes necessários para o desenvolvimento fetal (Melo *et al.*, 2007).

Estudos, tanto com seres humanos quanto com animais, têm mostrado associação entre perturbações do ambiente intrauterino e alteração nos padrões de crescimento bem como modificações metabólicas na vida adulta (Ross, 2014). Com isso, tem sido utilizado o conceito de *early life programming*, que se refere ao fenômeno ocasionado durante o período do desenvolvimento fetal e nas fases iniciais da infância, o qual define que perturbações durante essas fases causam alterações metabólicas permanentes (Mathias *et al.*, 2014).

Fatores ambientais aos quais a mãe possa ser exposta (como a dieta, infecções e hormônios do estresse) podem afetar o ambiente materno, alterando os níveis circulantes de citocinas, lipídeos, hormônios do estresse e padrões metabólicos. Essas mudanças podem ser transmitidas pela placenta, impactando no desenvolvimento do feto. Dessa forma, tanto as células germinativas quanto as somáticas podem sofrer uma reprogramação, o que pode repercutir de alguma forma na vida do animal quando adulto (Bale, 2015) (Figura 1).

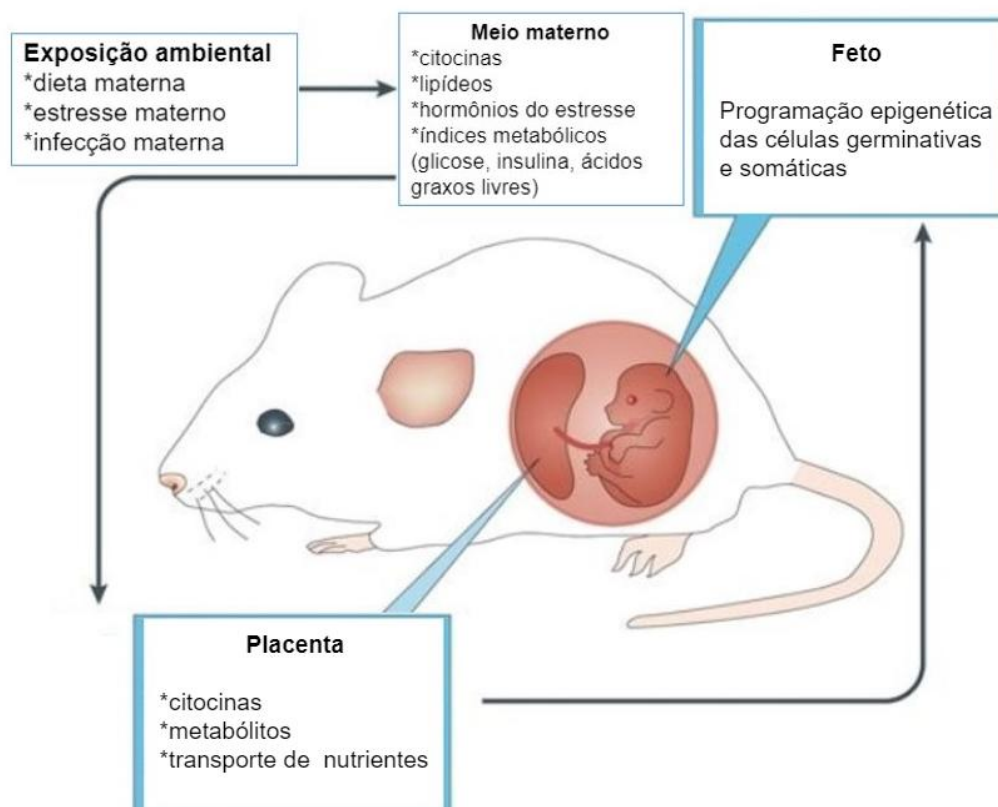


Figura 1: Interações complexas entre o ambiente materno, o placentário e o fetal durante o período gestacional. (Figura modificada de Bale, 2015).

Para investigar a influência da dieta materna sobre a prole, modelos animais são amplamente utilizados. Tem-se observado que a dieta hiperlipídica ofertada para a mãe durante a gestação e/ou lactação aumenta a susceptibilidade da prole para o desenvolvimento de doenças crônicas na fase adulta, acarretando efeitos deletérios nos filhotes (como alta adiposidade corporal, níveis de triglicerídeos e glicemia elevados e sensibilidade reduzida à insulina, além de acarretar déficits de funções cognitivas) (Bale *et al.*, 2010; Ainge *et al.*, 2011; Fuente-Martin *et al.*, 2013; Watkins *et al.*, 2015).

Um estudo de De los Ríos *et al.* (2018), com ratos, demonstrou que a dieta hiperlipídica da genitora (2,91kcal/g, sendo que 28%, 13,5% e 58% de calorias eram de proteínas, gorduras e carboidratos, respectivamente), no período pré-gestacional, gestacional e da lactação levou ao aumento do peso corporal, adiposidade, esteatose hepática, hiperinsulinemia e resistência à insulina na

prole após o desmame. Também observaram redução nos níveis de prolactina sérica, redução da expressão do receptor de prolactina (*Prlr*) na glândula mamária, bem como alteração na estrutura e função da glândula mamária nas genitoras.

Estudos prévios com roedores demonstraram que a dieta hiperlipídica no período gestacional acarreta alterações na amamentação, além de severas alterações morfológicas (Buonfiglio *et al.*, 2016; Hernandez *et al.*, 2012), de forma a afetar a lactação, o fluxo sanguíneo local e causar apoptose de células (Svennersten-Sjaunja & Olsson, 2005). Ademais, deficiências no leite materno afetam consideravelmente o desenvolvimento da prole (Góes *et al.*, 2012).

Por outro lado, a restrição calórica tem sido amplamente estudada para avaliar a longevidade em animais de vida curta (como roedores) e, com isso, tem sido demonstrado que a restrição calórica moderada retarda o aparecimento de doenças crônicas, como arteriosclerose e diabetes, bem como reduz a incidência de doenças relacionadas com a idade avançada (Patel *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2007; Genaro *et al.*, 2009). Dietas de restrição calórica tem demonstrado ser protetiva, fornecendo ativação de vias anti-inflamatórias e antioxidantes (Lopez-Lluch & Navas, 2016). Apesar dos resultados serem favoráveis, ainda não estão completamente elucidados os mecanismos de ação por meio dos quais a restrição calórica exerce seus efeitos (Fontana *et al.*, 2010; Longo & Finch, 2003; Roth & Polotsky, 2012; Pallavi *et al.*, 2012). A dieta de restrição calórica pode ser realizada por meio do controle do alimento fornecido ou pela alteração dos componentes presentes na dieta a fim de reduzir as calorias (Speakman & Mitchell, 2011).

Contudo, dietas muito restritivas durante o período gestacional podem ser prejudiciais ao desenvolvimento da prole, causando efeitos deletérios, como baixo peso ao nascer, aumento da susceptibilidade de parto prematuro, aumento do risco de resistência à insulina, bem como desenvolvimento de diabetes e hipertensão (Symonds *et al.*, 2009; Simmons *et al.*, 2001). Uma restrição calórica moderada pode ser aconselhada em circunstâncias especiais, como diabetes gestacional (Moreno-Castilla & Hernandez, 2016).

Em relação à subnutrição materna, sabe-se que a mesma pode afetar o desenvolvimento placentário, alterando sua vascularização e o transporte de nutrientes para o feto, como isso, impacta o desenvolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, prejudicando a formação do sistema musculoesquelético e tecido adiposo da prole. A subnutrição materna também é fator crítico para a saúde da prole a longo prazo, proporcionando o possível surgimento de doenças metabólicas e cardiovasculares na vida adulta (Funston *et al.*, 2010; Watkins *et al.*, 2015; Tsuneda, 2017).

1.2 Prolactina e seu receptor

A prolactina (PRL) é um hormônio secretado pela adeno-hipófise por células do tipo lactotrofos. Em humanos, apenas um gene codifica a PRL e está localizado no cromossomo seis p22.2-p21.3, sendo composto por cinco éxons e quatro íntrons (Guelho *et al.*, 2016). Este hormônio é constituído por cento e noventa e nove aminoácidos e três pontes bissulfídicas, sendo uma proteína da família dos hormônios somatotrópicos (Leite *et al.*, 2007; Freeman *et al.*, 2000).

Em camundongos, ao menos vinte e seis genes agrupados em uma região de 1Mb do cromossomo treze codificam a PRL (Ain *et al.*, 2004). A PRL possui múltiplas funções biológicas, atua na reprodução (impactando na fertilidade e no progresso da gestação), na lactação, no metabolismo energético, na imunorregulação, na osmorregulação (Figura 2). Por apresentar funções tão diversas, a PRL tem sido foco de estudos sobre sua distribuição extra-hipofisária e outros mecanismos de regulação (Marano & Ben-Jonathan, 2014; Guelho *et al.*, 2016).

A via dopaminérgica túbero-hipofisária está envolvida no controle da secreção de PRL, e o controle inibitório tônico é mantido pelo hipotálamo através da secreção da dopamina (Rang *et al.*, 2016). O comprometimento do hipotálamo ou o bloqueio do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário geralmente aumenta a secreção de PRL enquanto deprime a secreção dos outros hormônios adeno-hipofisários (Guyton & Hall, 2011). A PRL possui duas vias regulatórias a partir do

hipotálamo, uma inibitória (mediada pela dopamina, que atua através do receptor de dopamina subtipo D2 (D2R), sendo o principal regulador da síntese e secreção de PRL) e outra excitatória (mediada pelo hormônio liberador de tireotrofina, pela ocitocina e peptídeo intestinal vasoativo) (Tovar & Diéguez, 2014).

Por muitos anos, considerou-se que a PRL tinha como função apenas a lactação e a reprodução. No entanto, estudos recentes têm demonstrado diversos efeitos biológicos e estas funções são possíveis devido a ampla distribuição dos seus receptores em diferentes tecidos e tipos celulares (Ben-Jonathan & Hugo, 2006; Marano & Ben-Jonathan, 2014; Carré & Binart, 2014; Binart, 2017).

O *PRLR* pertence à superfamília dos receptores de citocinas transmembrana de classe I, sendo codificado por um único gene localizado no cromossomo cinco p14-p13.2 em humanos, cromossomo 15 em camundongos e cromossomo 2 em ratos (Patil *et al.* 2014; Sangeeta Devi & Halperin 2014; Carretero *et al.*, 2018; Binart, 2017). O gene *Prlr* possui uma estrutura genômica complexa, inclui uma região promotora e múltiplos primeiros éxons, cuja ativação regula a transcrição do gene (Swaminathan *et al.* 2008). As variantes do receptor podem ser geradas por *splicing* alternativo do primeiro transcrito ou por divisão pós-transcricional, obtendo diferentes isoformas que compartilham uma grande parte da estrutura e que constituem as duas metades do receptor completo (Patil *et al.* 2014).

Em humanos, foram descritas até cinco isoformas do receptor de membrana solúveis: a forma longa (PRL-RL); a forma intermediária (PRL-RI), (presente em humanos mas não em camundongos) (Sangeeta Devi e Halperin 2014); e as três isoformas curtas (PRL-RS) Δ S1, S1a e S1b, que compartilham um domínio extracelular comum, mas possuem um domínio intracelular divergente. Menos isoformas estão descritas em roedores, embora as principais isoformas, *Prl-rl* e *Prl-rs*, tenham sido encontradas em ratos e camundongos (Ben-Jonathan & Hugo 2015; Carretero *et al.*, 2018).

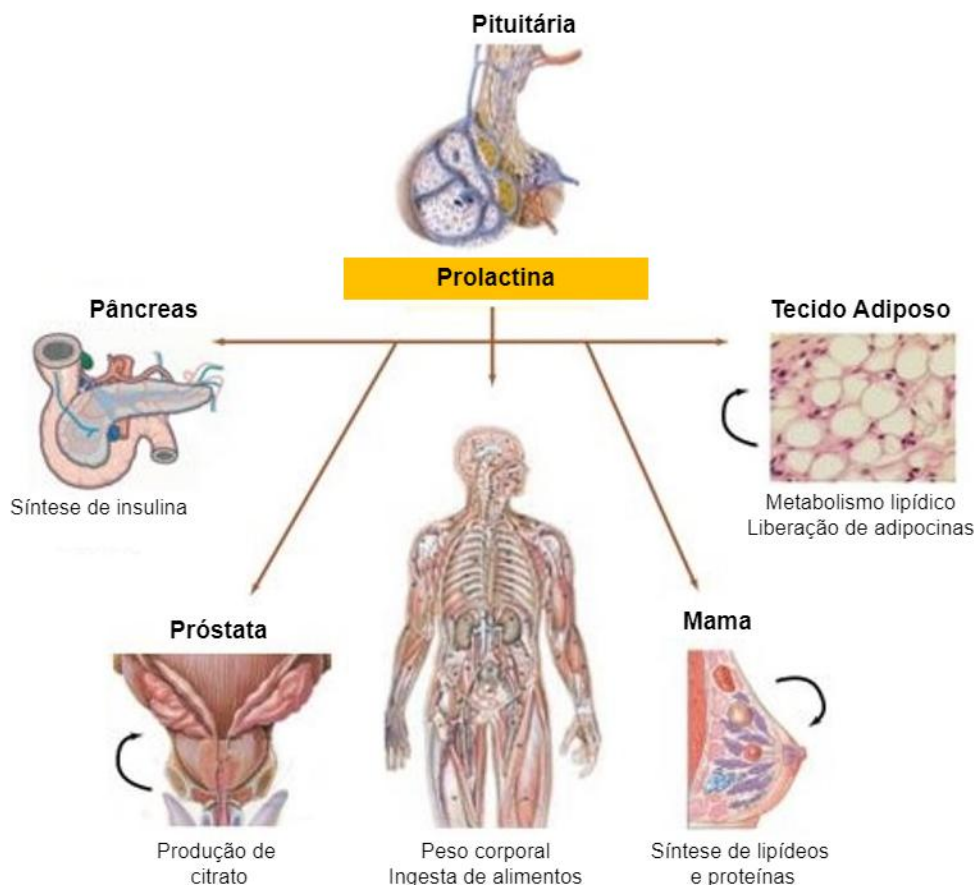


Figura 2: Ações metabólicas da prolactina na composição corporal, pâncreas, próstata, mama e tecido adiposo. (Figura modificada de Ben-Jonathan *et al.*, 2006)

1.3 Vias de sinalização da prolactina no tecido adiposo

O *PRLR* encontra-se na membrana plasmática dos adipócitos e sua ativação promove diversos efeitos na célula. A via clássica de ativação descrita é a via Janus Kinase (JAK) e do transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) (via JAK/STAT). Entre oito membros da família STAT, quatro foram identificados com proteínas transdutoras do *PRLR*, sendo elas: STAT1, STAT3, STAT5a e STAT5b (Carré & Binart, 2014). A dimerização do receptor ocorre quando uma molécula de PRL se liga ao seu receptor, ativando a JAK2, que fosforila o receptor e se autofosforila em múltiplas tirosinas. O domínio SH2 das

STATs se liga às fosfotirosinas do *PRLR* e as moléculas STAT são fosforiladas pela JAK2 associada ao receptor. As STATs fosforiladas se dissociam do complexo receptor-JAK2 e movem-se para o núcleo da célula, onde ativam a transcrição dos genes-alvo promovendo assim a proliferação e a diferenciação celular. Após a ativação da via de sinalização teremos efeitos biológicos no tecido adiposo. Embora a JAK/STAT seja a via principal de ativação gênica, existem outras duas vias que são: a PI3K-Akt e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (Naliato *et al.*, 2008; Carré e Binart, 2014) (Figura 3).

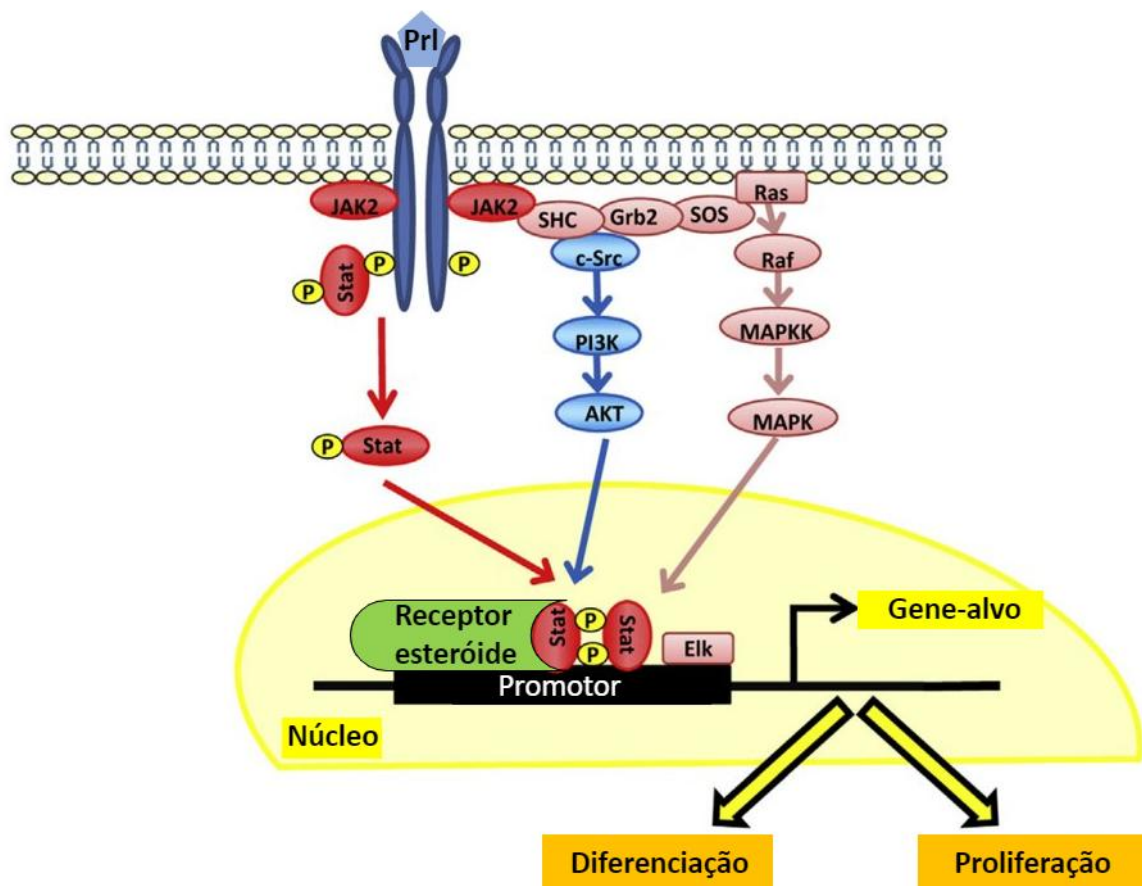


Figura 3: Esquema representando as vias de sinalização da prolactina no tecido adiposo. (Figura modificada de Carré & Binart, 2014)

A PRL ligando-se ao seu receptor, ativando-o, afeta o metabolismo lipídico. Ocorre inibição da lipoproteína lipase (LPL), que estará envolvida no aumento do

acúmulo dos ácidos graxos na célula (aumentando assim a adipogênese que fornece ácidos graxos livres (AGL) para o adipócito), e suprimindo a ácido graxo sintase (FAS), que converte malonil-CoA em AGL. Malonil-CoA (percursor na síntese de ácidos graxos) é derivado da glicose, que é transportada para a célula pelo transportador insulina-dependente GLUT4. Em humanos, foi sugerido que a inibição da lipogênese pela ação da PRL no tecido adiposo ocorra pela diminuição da concentração de malonil-CoA (Nilsson *et al.*, 2009; Carré e Binart, 2014).

Em síntese, inibindo a LPL e suprimindo a FAS, teremos um aumento no estoque de ácidos graxos no interior do adipócito, acarretando no aumento da gota lipídica e, conseqüentemente, aumento da adipogênese (Ben-Jonathan & Hugo, 2006). Adicionalmente, a PRL inibe a secreção de adiponectina e interleucina 6 (IL-6), inibe ou estimula a leptina (dependendo do estado metabólico do indivíduo) (Figura 4).

LaPensee *et al.* (2006), em um estudo com camundongos, demonstrou que a PRL desempenha um papel significativo no metabolismo da glicose e no metabolismo lipídico, com destaque na regulação da secreção de várias moléculas pelos adipócitos. A PRL está presente no tecido adiposo dos adultos de muitas espécies (Ben-Jonathan *et al.*, 2007; Freemark *et al.*, 2002), bem como, durante o desenvolvimento fetal, especialmente em ovelhas (Symonds *et al.*, 1998; Pearce *et al.*, 2005; Carré & Binart, 2014).

Estudos com roedores indicam que a expressão do gene da PRL aumenta durante o período da lactação no tecido adiposo, esse aumento pode ocorrer pois a PRL é capaz de induzir a expressão do *Prlr*, tanto em estados diferenciados quanto em não-diferenciados (Ling *et al.*, 2000; Carré & Binart, 2014). Em roedores, ao longo da lactação, a PRL promove no tecido adiposo, a diminuição da lipogênese, reduzindo as atividades da LPL, FAS e acetil-CoA (Barber *et al.*, 1992).

Em humanos, a PRL regula a secreção de insulina durante a gravidez pois as células beta expressam alta densidade do *PRLR* (Ben-Jonathan & Hugo, 2006). Ademais, tem sido demonstrado que a PRL inibe a atividade LPL no tecido adiposo branco humano (Ling *et al.*, 2003; LaPensee *et al.*, 2006; Brandebourg *et al.*, 2007; Carré & Binart, 2014).

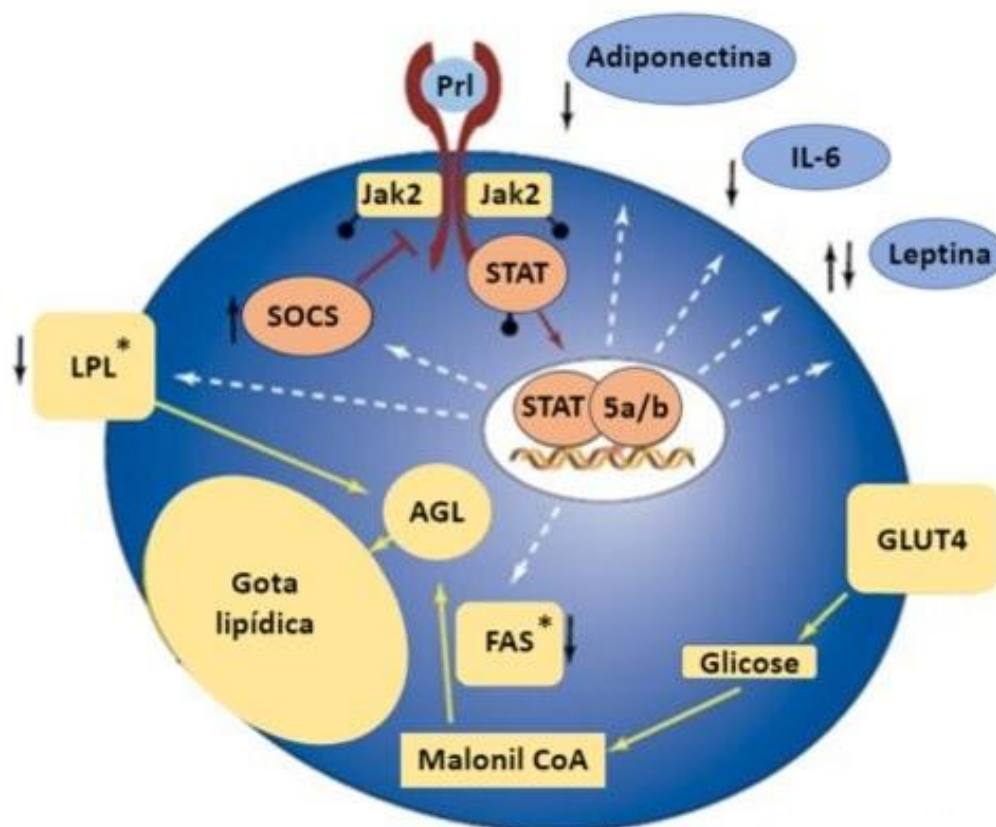


Figura 4: Efeito metabólico da prolactina no tecido adiposo. (Figura modificada de Ben-Jonathan, 2006)

1.4 Hipotálamo, prolactina e regulação do metabolismo energético

O hipotálamo tem importante papel na regulação do metabolismo energético e no ganho de peso corporal (Begg e Woods, 2013; Simpson *et al.*, 2009; Schneeberger *et al.*, 2014; Stefanidis *et al.*, 2014; Morton *et al.*, 2006). Está localizado na parte ventral do diencéfalo e é organizado em populações neuronais distintas, denominadas núcleos. Os núcleos que desempenham papéis importantes na modulação do metabolismo energético são: núcleo arqueado (ARC), hipotálamo lateral (LHA), núcleo paraventricular (PVH), núcleo ventromedial (VMH) e núcleo dorsomedial (DMH) (González-García *et al.*, 2016; Lopez *et al.*, 2013, Velloso *et al.*, 2011) (Figura 5).



Figura 5: Núcleos hipotalâmicos que participam da regulação do balanço energético e peso corporal. (Figura modificada de López *et al.*, 2013)

Como sensor homeostático, o hipotálamo recebe múltiplas informações, como a experiência sensorial de comer, o processo de ingestão, de absorção intestinal, bem como os níveis de metabólitos circulantes e do armazenamento energético. Uma vez que esta informação é integrada, o hipotálamo tem a capacidade de responder com ações apropriadas, tais como: regulação da fome, da saciedade e, subsequentemente, o comportamento alimentar (González-García *et al.*, 2016; Waterson *et al.*, 2015; Schneeberger *et al.*, 2014).

É por meio dessa integração de sinais que o hipotálamo regula o equilíbrio de energia e gera uma saída adequada na modulação da ingestão de alimentos e do metabolismo energético (Morton *et al.*, 2006; Waterson *et al.*, 2015). A manutenção desta sintonia é fundamental, caso contrário, pode ocorrer um

desbalanço da homeostase energética corporal a longo prazo (Karnani *et al.*, 2011; Lam *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2008) acarretando uma série de distúrbios, como anorexia, hiperfagia, obesidade e suas complicações (como diabetes mellitus, hipertensão, doença hepática gordurosa) (Oh *et al.*, 2016).

Centralmente, a PRL participa da regulação da homeostase da glicose e no controle do apetite (Moore *et al.*, 1986; Gerardo-Gettens *et al.*; 1989; Noel & Woodside., 1993; Buntin *et al.*, 1999). *PRLR* são encontrados em núcleos do hipotálamo envolvidos na regulação homeostática da ingesta alimentar, como os núcleos ARC, VMH e PVH (Bakowska & Morrell., 1997; Pi & Grattan., 1998; Brown *et al.*, 2010). Um estudo de Sauv e & Woodside (2000) demonstrou que inje es de PRL no núcleo PVH de ratos promove a estimula o da ingesta de alimentos de maneira dose-dependente. Estudos de associa o genômica ampla revelaram que uma variante comum adjacente ao gene da PRL está associada ao desenvolvimento da obesidade (Meyre *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2011; Grattan, 2015).

Sabe-se que o consumo de dieta rica em gordura saturada desencadeia uma resposta inflamatória no hipotálamo, que tem sido caracterizada por uma expressão inicial de genes pr -inflamatórios seguidos de astrocitose hipotalâmica, microgliose e aparecimento de marcadores de lesão neuronal (Horvath *et al.*, 2010; Valdearcos *et al.*, 2017). Em uma pesquisa recente, Lizarde *et al.*, (2018) demonstrou que o consumo de uma dieta rica em gordura altera o metabolismo energético no hipotálamo de ratos. No estudo, foi encontrado que uma dieta rica em gordura afeta significativamente os níveis hipotalâmicos de glicose, osmólitos e neurotransmissores.

A proteína quinase hipotalâmica ativada por AMP (AMPK) integra diversos sinais hormonais e nutricionais para manter o balanço energético. Evidências recentes sugerem que diferentes hormônios, nutrientes e substâncias químicas sint ticas podem modular a atividade da AMPK no hipotálamo, regulando a ingestão de alimentos e o peso corporal por meio da expressão de neuropeptídios (Oh *et al.*, 2016). O metabolismo lipídico hipotalâmico desempenha um papel importante na regula o fisiológica do balanço energético através da modula o da atividade de enzimas que controlam a biossíntese lipídica (como a FAS e a

AMPK) impactando tanto na alimentação quanto no gasto energético (González-García *et al.*, 2016).

1.5 Receptor de estrógeno alfa

O receptor de estrógeno alfa (*ESR1*) atua como fator de transcrição ligante ativado, regulando a expressão de uma variedade de outros genes, controlando vias metabólicas e exercendo funções biológicas. A expressão do *ESR1* é observada em diversos tecidos, inclusive nos tecidos com alta atividade metabólica e demanda energética, o que demonstra sua importante atuação no controle do balanço energético. Estudos, em humanos, sugerem interação entre *ESR1* e doenças metabólicas, como diabetes, obesidade e doenças cardíacas (Ranhotra, 2010).

Em camundongos, a deleção do gene *Esr1* aumenta a adiposidade acarretando síndrome metabólica (Heine, 2000). Estudos com animais demonstram que o *Esr1* é expresso em regiões do hipotálamo relacionadas com a regulação da homeostase energética, como o núcleo ventrolateral (VLH), área pré-óptica medial (MPOA), ARC e PVH (Osterlund *et al.*, 1998; Merchenthaler *et al.*, 2004; Simonian & Herbison, 1997; Voisin & Herbison, 1997; Simerly *et al.*, 1990; Frank *et al.*, 2014).

Estudos demonstraram que a supressão da expressão do *Esr1* em neurônios do VMH resulta em um aumento significativo de peso corporal em camundongos fêmeas, mas não em machos. Além disso, as fêmeas ganharam uma quantidade significativa de tecido adiposo visceral perigonadal e manifestaram termogênese desregulada (Musatov *et al.*, 2007; Frank *et al.*, 2014). Esses achados demonstram que a atividade do *Esr1*, especificamente no VMH, é fundamental para a regulação do gasto energético no sexo feminino (Frank *et al.*, 2014).

1.6 Estresse Oxidativo

Em 1985, Sies definiu o estresse oxidativo como “desequilíbrio do sistema pró-oxidante/antioxidante, em favor dos pró-oxidantes, levando ao dano potencial”. O estresse oxidativo ocorre quando as espécies reativas de oxigênio (EROs) não são contrabalançadas pela ação das defesas antioxidantes como, por exemplo, as catalisadas pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e pela glutathiona peroxidase (GPX). Pode ocorrer também por uma perturbação do equilíbrio redox das células (Pisoschi & Pop, 2015). Os oxidantes também podem ser gerados por diferentes tipos de radiações, como raio-X, ultrassom e micro-ondas (Sies, 1997).

O estresse oxidativo afeta proteínas, lipídios e o DNA, podendo levar à citotoxicidade (Betteridge, 2000). Sabe-se que a deterioração da capacidade de defesa antioxidante está associada ao declínio de função celular bem como a diversas patologias (como doenças cardiovasculares e câncer) e senescência (Sies, 1985; Halliwell, 2007; Lopez-Alarcóna & Denicola, 2013).

O sistema de defesa antioxidante das células pode ser enzimático e não-enzimático. Em relação as defesas enzimáticas, a SOD, a CAT e a GPX são enzimas essenciais na defesa celular contra o estresse oxidativo, protegendo as células contra danos causados por espécies reativas (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Quanto as defesas não-enzimáticas, podemos destacar as vitaminas. A vitamina E, na forma α -tocoferol, possui potente efeito antioxidante e está presente em diversos alimentos consumidos na dieta, como em óleos vegetais, cereais e leguminosas (Devaraj *et al.*, 2005). Há o ácido ascórbico, conhecido como vitamina C, também um eficiente antioxidante e está presente nos processos de regeneração do α -tocoferol (Devaraj *et al.*, 2005). Somando-se aos demais antioxidantes não-enzimáticos, há o β -caroteno (precursor da vitamina A), abundante em frutas e vegetais amarelo-alaranjados (Krinsky & Johnson, 2005).

A gravidez trata-se de um período de adaptação metabólica na qual ocorre um aumento da demanda energética e de oxigênio. Dessa forma, durante a gestação, mãe e feto sofrem de estresse oxidativo durante esse período (Mutinati

et al., 2013). Ademais, o aumento da peroxidação lipídica associada a redução das atividades antioxidantes podem contribuir para o desenvolvimento de complicações na gestação (Rejitha & Karthiayini, 2014).

Estudos demonstram que a relação entre a dieta rica em gordura e o estresse oxidativo desempenham um papel crítico na patogênese de doenças (Muthulakshmi & Saravanan, 2013). A obesidade também é caracterizada por um estado oxidante-antioxidante desequilibrado (Karaouzene *et al.*, 2011; Warolin *et al.*, 2013; Kaur, 2014; Gallardo *et al.*, 2015) e o estresse oxidativo pode ser tanto o gatilho quanto o resultado da obesidade (Rani *et al.*, 2016). Quando a obesidade e a gravidez são combinadas, pode ocorrer um aumento acentuado da expressão do estresse oxidativo, acarretando assim em efeitos prejudiciais à saúde da mãe e da prole.

A redução da ingesta calórica sem desnutrição tem sido descrita na literatura como uma abordagem protetora, contribuindo para o aumento da longevidade bem como proporcionando ativação de vias anti-inflamatórias e antioxidantes (Lopez-Lluch & Navas, 2016). A ativação de vias antioxidantes bem como a diminuição na formação de espécies reativas (principalmente mitocondriais) têm demonstrados serem fatores importantes no aumento da expectativa de vida de animais alimentados com dieta de restrição calórica (Sohal & Weindruch, 1996; Barja, 2004; Gredilla & Barja, 2004).

Dessa forma, nossa hipótese é que a dieta materna pode afetar tanto a saúde das mães quanto a dos filhotes. Assim, acreditamos que a dieta hipercalórica impactará de forma negativa nos parâmetros bioquímicos, promovendo estresse oxidativo por meio do aumento na produção de EROs, diminuição da atividade da SOD e da CAT e maior expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* nos tecidos avaliados. Por outro lado, nossa hipótese em relação a dieta de restrição, concentra-se nos benefícios que ela pode promover sobre os parâmetros estudados e na capacidade de reverter parâmetros já alterados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o impacto de diferentes dietas, ao longo da gestação e da lactação, em parâmetros bioquímicos e na expressão de genes relacionados com o metabolismo energético, no tecido adiposo e no hipotálamo das genitoras e da prole (machos adultos) ao longo da vida.

2.2 Objetivos Específicos

Avaliar nas genitoras, que receberam diferentes dietas ao longo da gestação e da lactação:

- Perfil metabólico e peso corporal;
- Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no tecido adiposo;
- Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido adiposo;
- Expressão gênica dos receptores de prolactina e de estrógeno alfa no tecido adiposo e no hipotálamo.

Avaliar na prole (machos), que foram expostos a diferentes dietas ao longo da vida:

- Peso corporal durante a lactação;
- Formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) no tecido adiposo;
- Atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) no tecido adiposo;
- Expressão gênica dos receptores de prolactina e de estrógeno alfa no tecido adiposo e no hipotálamo na vida adulta.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado como *Dietary interventions of dams affect oxidative stress, gene expression of the Prlr and Esr1 in periferic and central tissues of offspring mice* está em preparação para submissão à revista *Physiology & Behavior*.

Fator de impacto (2018): 2.635

Dietary interventions of dams affect oxidative stress, gene expression of the *Prlr* and *Esr1* in periferic and central tissues of offspring mice

Mariana Fraga Gauthier^a, Andressa Alves de Andrade^a, Joana Fisch^b, Vanessa Feistauer^a, Ana Moira Morás^a, Luiza Steffens Reinhardt^a, Ana Carolina de Moura^a, Silvana de Almeida^a, Dinara Jaqueline Moura^a, Márcia Giovenardi^{a,b}

^a *Programa de Pós-Graduação em Biociências, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245 - CEP 90050-170 - Porto Alegre, Brazil*

^b *Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Rua Sarmiento Leite, 245 - CEP 90050-170 - Porto Alegre, Brazil*

Corresponding Author: Dr Márcia Giovenardi
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Rua Sarmiento Leite, 245/308C
Porto Alegre/RS, 90050-170, Brazil
Tel. +55-51-33308751
E-mail: giovenardi.marcia@gmail.com

ABSTRACT

Several studies have examined the repercussion of the maternal nutritional status during pregnancy and lactation on the progeny. They demonstrated that the environment might contribute to the promotion of fetal reprogramming, which will have some impact in the offspring's adult life. The present study analyzed: a) metabolic profile in mice dams, b) parameters of oxidative stress in the adipose tissue, and c) gene expression of the prolactin (*Prlr*) and alpha estrogen (*Esr1*) receptors, in the adipose tissue and hypothalamus, in dams and in their male offspring that received standard (CONT), restrictive (RD) or hypercaloric (HD) diet. The dams were fed during mating, pregnancy and lactation, and the lipid profile, glucose, insulin and leptin serum concentration were analyzed. In the adipose tissue, the reactive oxygen species (ROS) production and the activities of catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes were also analyzed in the dams and in the male offspring. The gene expression analyzes of the *Prlr* and *Esr1* receptors were also made. We found a significant increase in triglycerides and leptin concentrations, and a decrease in the SOD activity of the HD-fed dams. In the offspring, we observed the maternal diet effect (HD-fed dams) in the increase of DCF, SOD and CAT in the adipose tissue of RD-fed offspring. The expression of *Prlr* in the adipose tissue of the offspring also demonstrated a maternal diet effect, where RD/RD had a decreased expression compared to HD/RD; and RD/RD had lower expression of *Esr1*, compared to HD/RD. In the hypothalamus we found a decrease in the expression of *Prlr* in RD and HD dams, when compared to CONT; and a decreased *Prlr* expression in RD/RD and HD/RD, when compared to CONT/RD; also, a reduction in the expression of *Prlr* in RD/HD when compared to CONT/HD. The gene expression of *Esr1* in the hypothalamus of the offspring

had a maternal diet effect as well, with a decreased expression in RD/HD compared to CONT/HD and HD/HD. In conclusion, HD promoted metabolic dysfunction in the dams, and although RD did not cause any harmful effect during the reproductive period and lactation, it may cause subfertility. Also, nutritional interventions during the reproductive period should be carefully applied, since the impact on the metabolic parameters of the mother can reflect on the health of the offspring.

Keywords: oxidative stress, energy metabolism, caloric restriction, hypercaloric diet, hypothalamus, adipose tissue.

1. INTRODUCTION

Mounting evidence has shown that maternal nutritional status may affect the progeny not only in a short-term but also in a long-term way, since some dysfunctions caused by maternal diet may appear only in the offspring adulthood. The consumption of a high-fat diet by the mother during pregnancy is associated with reduced insulin and glucose sensitivity, increased body size and adiposity, hypertension, dyslipidemia, cardiovascular disease, alteration in reproductive hormones, and modifications on sexual performance of the offspring^[26,19]. On the other hand, nutrient restriction in the intrauterine life, which could be caused by protein restriction, caloric restriction or intrauterine artery ligation, is associated with low weight at birth, prematurity, increased risk of lung infections, chronic obstructive pulmonary disease, increased risk of glucose intolerance, insulin resistance, diabetes and hypertension^[42,41]. Thus, restrictive diets during pregnancy can be harmful, but a moderate caloric restriction is advised in special circumstances such

as gestational diabetes mellitus^[28]. Nonetheless, caloric restriction has been described as a protective approach that may increase longevity by providing activation of anti-inflammatory and antioxidant pathways^[23].

It has been shown that prolactin (PRL) affects glucose and lipid metabolism^[4, 11]. In adipose tissue, PRL inhibits adiponectin and interleukin-6 secretion and, depending on the metabolic state, decreases or stimulates leptin secretion, affecting the adipogenesis^[21]. In the hypothalamus, PRL has an integrative role in the regulation of energy balance, acting on the modulation of food intake and energy metabolism^[27, 14, 32, 10, 29, 41], and their receptors are located in the nuclei of the hypothalamus involved in the homeostatic regulation of food intake, such as arcuate, ventromedial and paraventricular nuclei^[1, 36, 9].

A growing number of studies are focusing on the repercussion of the maternal nutritional status, during pregnancy and lactation, on the progeny. They have demonstrated that early diet manipulations can impact physiological programming. These results contribute to the understanding that the environment and the behavior can affect the fetal reprogramming, through epigenetic mechanisms that can modify the gene expression transgenerationally^[37, 2]. Here, we fed female mice during mating, pregnancy and lactation with three types of diets: standard (CONT), restrictive (RD) or hypercaloric (HD) diets. In addition, RD has been showing beneficial results on the modulation of metabolism, but its utilization during pregnancy is still controversial. Thus, the aim of the present study was to analyze the metabolic profile in dams' mice, oxidative stress and gene expression of the prolactin (*Prlr*) and alpha estrogen (*Esr1*) receptors, in the adipose tissue and hypothalamus, of the dams and male offspring that received CONT, RD and HD.

2. EXPERIMENTAL PROCEDURE

2.1 Animals

Eighty two male and 24 female BALB/c albino mice were obtained from the Animal Housing Facility of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Animals were properly housed and maintained under controlled temperature ($23\pm 1^{\circ}\text{C}$), humidity ($55\pm 5\%$) and illumination (12 h light/dark cycle; lights on at 4 a.m.) conditions. All procedures followed the ethical rules established by the guidelines of the Brazilian Society for Neuroscience and Behavior and the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Institute for Laboratory Animal Research. The Institutional Animal Care and Use Committee of UFCSPA (#388/15 and 544/17) approved this study. All efforts were made in order to minimize animal suffering and to use only the number of animals necessary to produce reliable scientific data.

2.2 Experimental procedures

Dams Experiment

Sixty days old females, weighing between 18-24 g, were divided into three groups (n=8 females per group) and housed individually with water *ad libitum*. The control group (CONT) received standard mice chow (Nuvital, Curitiba, Brazil) *ad libitum*, with a total energy content of 3.4 kcal/g (63% carbohydrate, 26% protein, 11% fat); the restrictive diet group (RD) had a 30% caloric restriction; and the hypercaloric diet group (HD) received a chow (Pragsoluções Biociências, Jaú, Brazil), with total energy content of 4.9 kcal/g (40.30% carbohydrate, 11.35% protein, 48.34% fat).

Before the beginning of the experiment, the amount of chow consumption was monitored and based on that, we determined the amount of food that would be offered to RD group, considering that these mice should receive 30% less chow than CONT animals.

This monitoring was performed during the whole experiment. Male mice were housed 5 per cage with food and water *ad libitum*.

After 25 days of diet administration, female were housed with male mice, in a ratio of 3:1, for mating. Confirmation of gestation was performed by the identification of sperm in vaginal smears. During pregnancy, females were kept in individual cages. Body weight and naso-anal length of the dams was measured on the postpartum day (PPD) 22. Lee index was calculated by the cube root of the body weight (g) divided by the nasoanal length (cm) multiplied by 1000 ^[6]. Thus, females were fed with CONT diet, RD or HD before mating, as well as during pregnancy and lactation, totalizing approximately 70 days of diet intervention.

Offspring Experiment

After delivery, the pups were standardized in 8 per group, totalizing 9 groups. The litters were weighed on the 3, 8, 12 and 21 PPD. After weaning, male pups of each mother's group who received the three types of diet (CONT, RD, HD) started to be fed with one of these three types of diets: CONT, HD or RD. Male mice were housed in three or four per cage.

The experimental groups were abbreviated accordingly maternal/offspring diets: CONT/CONT, CONT/RD, CONT/HD, RD/CONT, RD/RD, RD/HD, HD/CONT, HD/RD, HD/HD.

2.3 Tissue and blood collection

On the PPD 22, mice dams were euthanized by decapitation and trunk blood was collected in sterile tubes. These blood samples were centrifuged at 3,000 rpm for 10 min at

4°C and stored at -20°C for posterior analysis. Abdominal adipose (around stomach, spleen, pancreas, small and large intestines) tissue and the hypothalamus were dissected protected from light, rapidly frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C.

At the 100 PPD, the male offspring were euthanized by decapitation and the tissues of interest were collected (abdominal adipose tissue and hypothalamus) following the same procedures that were taken with the samples of the mothers.

2.4 Serum Analysis

The concentration of glucose, triglycerides and total cholesterol in the serum were analyzed in the dams by enzymatic colorimetric method using commercial kits (Labtest) according to the manufacturer's specifications. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits were used to determine insulin (Sigma-Aldrich) and leptin (Sigma-Aldrich) concentration according manufacturer's instructions.

2.5 Oxidative stress parameters

The oxidative stress parameters were analyzed in the dams and offspring. Tissues were vigorously vortexed in Tris-HCl lysis buffer (10 mM; pH 7.4 with PMSF 1%) and then centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 4°C. The supernatants were used for the superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) assays, and all procedures were performed under cold conditions. Protein content was determined by the Lowry method^[23] using bovine serum albumin as standard.

2.5.1 Superoxide dismutase activity

SOD activity was evaluated by inhibition of the superoxide-dependent autoxidation of epinephrine. Briefly, 170 μL of a mixture containing 50 mM glycine buffer, pH 10.2, and 10 mM catalase were added to 20 μL of each tissue sample. Next, 10 μL of 60 mM epinephrine were also added to the sample. The absorbance reading at 480 nm was started immediately and recorded every 36 s over 10 min. The inhibition of autoxidation of epinephrine occurs in the presence of SOD, whose activity can indirectly be assayed spectrophotometrically. One SOD unit is defined as the amount of SOD necessary to inhibit 50% of epinephrine autoxidation and the specific activity is reported as SOD Units/mg protein.

2.5.2 Catalase activity

CAT activity was assayed according previously described method^[23] based on the disappearance of H_2O_2 at 240 nm wavelength. Briefly, 10 μl of each sample were added to 180 μl of potassium phosphate buffer (KH_2PO_4 20 mM, Na_2HPO_4 30 mM pH 7). Subsequently, 10 μl of 25 mM H_2O_2 were added and the absorbance was recorded immediately, every 36 s for 5 min, at 240 nm. One CAT unit is defined as one μmol of hydrogen peroxide consumed per minute and the specific activity is calculated as CAT Units/mg protein.

2.5.3 Dihydrodichlorofluorescein diacetate ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$) oxidation assay

The DCFH-DA assay is a reliable method for measuring intracellular reactive oxygen species (ROS). The method is based on the deacetylation of the DCFH-DA probe, and its subsequent oxidation by ROS into a highly fluorescent compound (2',7'-dichlorofluorescein; DCF). For this assay, phosphate-buffered saline (pH 7.4), 1 mM

DCFH-DA, and 5 μ L of tissue homogenate were incubated in 96-well dark plates at 37°C for 30 min. Fluorescence was obtained with excitation and emission wavelengths at 480 nm and 520 nm, respectively. All experiments were carried out in a dark room to prevent the oxidation of DCHF-DA. The results were expressed as intensity of fluorescence from DCF per mg of protein.

2.6 Molecular Analysis

2.6.1 Total RNA extraction

The molecular analysis was realized in the dams and offspring. Total RNA from the hypothalamic and adipose tissue were extracted by the TRIzol® method, according to the manufacturer's specifications. Samples were incubated with chloroform at room temperature, and then centrifuged. After centrifugation, it was in three phases: one phase containing chloroform and phenol, one interfase, and one aqueous phase. The latter was removed for RNA isolation. The quantification was done by spectrometry BioSpec-nano ® (Shimazu, Kyoto, Japan) at 260nm and 280nm.

2.6.2 RT-PCR

After total RNA extraction, cDNA synthesis (complementary DNA) was performed by reverse transcription reactions (reverse transcription kit). RNA was incubated with oligo (dT), dNTPs and DEPC water (diethyl pyrocarbonate) for 5 minutes at 65 ° C, followed by 1 minute on ice. Then, buffer solution, DTT (dithiothreitol) and RNaseOUT, were added for 2 minutes at 37 ° C. Finally, the enzyme M-MLV-RT was added for cDNA synthesis, for 1 hour at 50 ° C. The synthesis reaction was inactivated by incubation at 70 ° C for 15 min.

2.6.3 qPCR analysis of gene expression

Table 1 shows all primer sequences used in this study, which were designed using the software Primer-3^[39] based on mice mRNA sequences in the GenBank database^[5]. The specificity of the primers was checked using BLAST search against nucleotide collection (nr) of the NCBI database. All primers were purchased from Invitrogen, São Paulo, Brazil.

The analysis of the expression of the target genes (*Prlr* and *Esr1*) was performed at the transcriptional level, in which the mRNA content was evaluated, using specific primers to amplify the cDNAs of the genes that were studied. As an internal control of gene expression, Actin beta (*ActB*) and Peptidylprolyl isomerase (*PPIA*) genes (reference genes selected by previous experiments) were analyzed^[30]. Amplification products were analyzed using the SYBRTM Green method by Real-Time PCR (Life Technologies), and the relative quantification analysis was performed according to the results of the amplification efficiency tests of the genes, by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method^[22].

2.7 Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm S.E.M. Results were analyzed by one-way or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. Statistical analyses were made using GraphPad Prism 6, (La Jolla, USA). Differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. RESULTS

Table 2 shows serum biochemical parameters including glucose, triglycerides and total cholesterol concentration and weight gain and Lee's index of standard (CONT), restrictive (RD) and hypercaloric (HD) diet-fed mice. We found a significant increase in

serum triglyceride concentration in HD when compared to RD and CONT groups [F(2,16)=14.76, p=0.0004]. Leptin concentration were also higher in HD group [F(2,16)=12.79, p=0.0007]. Serum glucose, cholesterol and insulin concentration and weight gain and Lee Index did not show significant differences among groups (p>0.05).

The characteristics of mice pregnancy and of their pups are showed in the Figure 1. RD-fed mice exhibited an increased time (number of days) to become pregnant in comparison to the CONT group [F(2,33)=4.035; p=0.027], while no difference was observed in the HD group (Figure 1A). There was no significant difference in the number of pups per dam among groups (p>0.05) (Figure 1B). Figure 1C shows that HD group had a decrease in weight gain during pregnancy when compared with CONT group [F(2,35)=4.212; p=0.023] and on the weight gain of the pups evaluated until the 21 PND, RD group presented lower weight gain when compared with CONT group [F(2,42)=3.639; p=0.034] (Figure 1D).

Figure 2 shows ROS formation and antioxidant activity in the adipose tissue in the dams. We did not find any differences in ROS production (Figure 2A), neither in the CAT activity among groups (Figure 2C). However, SOD activity was significantly decreased in HD group when compared to CONT [F(2,17)=3.409; p=0.050] (Figure 2B). There were no differences in SOD/CAT ratio among groups (Figure 2D).

Figure 3 shows ROS formation and antioxidant activity in the adipose tissue of the offspring. Two-way ANOVA showed a maternal and offspring diet effects [F(2,62)=34.01; p<0.0001 and F(2,62)=3.821; p=0.027; respectively]. There was also an interaction between maternal and offspring diets [(F(4,62)=8.842; p<0.0001)].

ROS production was significantly increased in HD/CONT when compared to CONT/CONT and RD/CONT (p<0.0001 for both comparisons). In HD/HD ROS

production was higher than RD/HD and CONT/HD ($p < 0.0001$ for both comparisons) (Figure 3A). Concerning SOD activity (Figure 3B), we found a maternal diet effect [$F(2,60)=38.99$; $p < 0.0001$]. There was a significant increase in SOD activity in the offspring from HD dams, regardless offspring diet. But when we analyzed CAT activity (Figure 3C) we found a maternal diet effect [$F(2,44)=3.997$; $p=0.025$]. Post-hoc analysis of CAT activity showed an increase in HD/RD group when compared to CONT/RD ($p=0.01$). There were no differences in SOD/CAT ratio among groups (Figure 3D).

Figure 4A shows the gene expression of *Prlr* (Fig. 4A) and *Esr1* (Fig. 4B) in the adipose tissue of the dams, and no significant difference was found among groups. The expression of *Prlr* in the adipose tissue of the offspring is demonstrated in figure 5A, and found a maternal diet effect [$F(2,57)=3.542$; $p=0.035$]. RD/RD shown decreased significant in the gene expression of the *Prlr* when compared to HD/RD group ($p=0.013$). Thus, figure 5B demonstrated maternal diet [$F(2,58)=5.200$; $p=0.008$] effect where RD/RD had lower gene expression of *Esr1* when compared to HD/RD group ($p=0.019$).

In the figure 6, we found a decreased significant in the gene expression of *Prlr* in the hypothalamus of RD and HD dams when compared to CONT dams [$F(2,16)=11.39$; $p < 0.0001$], however, in the gene expression of *Esr1* in the same area in the CNS we did not find significant differences among groups.

The gene expression of *Prlr* in the hypothalamus of the offspring (Figure 7A) showed a maternal diet effect [$F(2,39)=13.26$; $p < 0.0001$]. There was a decreased *Prlr* gene expression in RD/RD and HD/RD when compared to CONT/RD ($p=0.016$ and $p=0.048$, respectively); and significant reduction in the expression of *Prlr* in the RD/HD when compared to CONT/HD ($p=0.003$). In relation to results of gene expression of *Esr1* (Figure 7B) in the hypothalamus of the offspring we observed again maternal diet effect

[F(2,44)=3.659; p=0.033]. In the post-hoc test, we found a decrease in the gene expression in RD/HD compared to CONT/HD (p=0.026) and HD/HD (p=0.028).

4. DISCUSSION

Existing data demonstrate that proper nutrition is fundamental to preserve mother's health and to ensure offspring survival^[8]. Pregnancy and lactation are characterized by high metabolic demand due to mother's physiological changes and to satisfy the requirements for fetal growth as well. In the present study, we show that restrictive diet consumption during pregnancy and lactation was able to modify the weight gain of the offspring, and RD-fed mice take longer to get pregnant, indicating that this diet may affect the reproductive function. Interestingly, the weight gain during pregnancy was less in the HD-fed mice.

As expected, we showed an increase in triglycerides and leptin serum concentration in HD-fed mice. It was previously demonstrated that cafeteria diet consumption during pre-gestational, gestational and lactation periods leads to hypertriglyceridemia and hyperleptinemia^[31,19]. However, differently from our study, they also found increased body weight, abdominal fat content and insulin concentration. It is worth to mentioning that cafeteria diet has been considered more obesogenic than high-fat diet^[34], which might explain these different results. Metabolic profile of RD-fed mice was similar to CONT mice indicating that caloric restriction does not exert a significant impact on the evaluated parameters.

There is a concern about caloric restriction during pregnancy, which may hamper the adequate development of the progeny. Our results show that neither RD nor HD interfere in the number of pups, demonstrating that these nutritional approaches do not imply in

short-term consequences on the progeny development. However, RD-fed females showed a delayed time to pregnancy in comparison to the CONT group. Obesity is usually associated with infertility, however,^[7] it seems that the consumption of a hypercaloric diet for a short period of time prior pregnancy, as performed here, is not sufficient to affect reproductive function. On the other hand, caloric restriction in mice, even for a few days before mating might exert a mild impact on the fertility. Leptin is an adipokine that modulate reproduction. Excessive or deficient concentration of leptin lead to alteration in reproductive function^[40]. Leptin plays a role in follicular development, but excessive concentration lead to anovulation and its deficiency causes hypothalamic-pituitary gonadal axis dysfunction^[35]. In the present study, there was no significant difference in leptin concentration between CONT and RD groups, but RD-fed mice showed almost half of the leptin serum concentration compared to CONT, which could be related to long time of these females to become pregnant.

Pregnancy *per se* is a condition of increased oxidative stress, as well as the obesity that is characterized by unbalanced oxidant-antioxidant status^[13]. When excessive gain weight and pregnancy are combined, massive oxidative stress may occur, which can be harmful to the mother and offspring's health. On the other hand, caloric restriction may exert a protective function because it enhances cellular autophagy, diminishes inflammation and oxidative stress, and thus, increases longevity^[16]. In this sense, caloric restriction is expected to improve the oxidative responses of metabolic tissues. Thus, caloric restriction does not seem to be a proper protective measure in the pre-gestational, pregnancy and lactation periods. The special need for nutrient intake seems to be a much more important factor in these periods.

The adipose tissue is the main energetic source of the organism. Adipocytes are the unique specialized cells for lipids storage as triacylglycerol in their cytoplasm, having intense metabolic activity and contributing to the control of the body's energy homeostasis^[20]. Our findings showed that the adipose tissue was slightly affected as a consequence of the diet modification, since only HD group showed a decrease in SOD activity compared to CONT, which may predispose to oxidative stress. However, we did not find differences in ROS formation related to diet type. In this sense, is important to consider that adipose tissue has high concentration of antioxidant enzymes to manage the high production of ROS. In obese individuals, the expression and activity of antioxidant enzymes such as CAT, SOD, and GPX decreased in the adipose tissue^[12]. These data indicate that an increase in ROS production and a decrease in antioxidant enzymes in obesity can lead to oxidative stress in adipose tissue^[25]. The absence of oxidative stress in the adipose tissue of dams can be associated with the physiological adaptations following pregnancy and lactation. It has been proposed that lactation resets the metabolism, since it mobilizes the energy storages to milk production, preventing the development of metabolic and cardiovascular diseases^[41]. Thus, it is reasonable to suppose that we did not find a remarkable oxidative stress condition in the present study since we evaluated tissues from female mice following lactation.

On the other hand, we have demonstrated that the hypercaloric diet consumed by the mothers during gestation and lactation led to oxidative unbalance in the adipose tissue in male offspring, showed by high production of ROS and SOD activity, independently on the diet consumed by the offspring. Thus, we demonstrated the effect of maternal diet on SOD and CAT activity in response to ROS production.

To the best of our knowledge, this is the first study showing the effects of RD and HD on the gene expression of *Prlr* and *Esr1* in the adipose tissue and hypothalamus of dams and male offspring mice. When we analyze the gene expression of *Prlr* and *Esr1* in the adipose tissue of dams, we didn't find any effect of the diet consumed for them, although HD-fed dams had high plasma triglycerides and leptin levels even though they lose weight during pregnancy. One of the aspects we need to considerer is that our study was performed with dams right after the lactation. In this phase important hormonal and metabolic changes occur and prolactin plasmatic concentration is naturally high in all groups. However, by analyzing the adult offspring, we found the influence of the maternal diet on the adipose tissue homeostasis, since the offspring from RD dams, that also received a RD, showed a decrease in the gene expression of *Prlr* and *Esr1*. Thus, it was observed that the expression of the evaluated genes was regulated by RD, showing an effect of maternal diet in the offspring.

In the adipose tissue, PRL plays an important role in lipid metabolism by regulating the secretion of molecules by adipocytes such as, leptin, interleukin-6 and adiponectin, besides it promote adipogenesis^[21]. Our study demonstrated that the combination of RD diet consumed by the mother and the offspring throughout life promoted the reduction in the expression of *Prlr* in the offspring, which directly affects the energetic metabolism of these animals. *Prlr* was reduced in the adipose tissue, we can infer a decreased intracellular signaling, which promotes the storage of fatty acids in the lipid droplet, and consequently, decreased adipogenesis [3]. In addition, the adipose tissue is also the target of estrogenic action because it has nuclear receptors where this hormone binds and acts as a transcription factor^[38]. Previous studies have shown^[18] that the deletion of *Esr1* in mice promotes an increase in body adiposity.

According to our findings, during lactation, the offspring of RD-fed dams, showed reduced weight gain. Therefore, it is essential to carry out studies that elucidate the understanding between the interaction of the maternal diet in the gestational and lactation periods, with the offspring diet throughout life^[37]. Bale (2015)^[2] has already described that environmental factors, such as maternal nutrition during pregnancy, can promote fetal reprogramming of the germinative and/or somatic cells, which will have some impact on the offspring's life as adults. We suggest that epigenetic mechanisms could be influencing the physiological programming of the descendants, particularly associated to early nutritional manipulation, since regardless of the diet that the offspring went through life, maternal nutrition was more important to interfere in the evaluated parameters shown here.

The central role of the hypothalamus in controlling food intake is well recognized. This area has a role in altering physiological programming, particularly associated to early nutritional manipulation^[24]. Furthermore, it has been shown^[33] that prenatal and early postnatal periods are critical for regulation of expression of hypothalamic orexigenic neuropeptides and their receptors, which also can be programmed by factors related to maternal diet. Previous studies^[12, 13, 15-17] demonstrated that the adult offspring, from HD-fed dams, presented hypertension, hypercholesterolemia, hyperphagia, overweight, and increased visceral fat, liver weight, blood glucose, and triglycerides levels. It is reasonable to suppose that these results could be associated with alterations in hypothalamic development. In our analyses of gene expression in the hypothalamus of the dams, we found a decrease of *Prlr* in RD and HD, compared to CONT. Regarding the offspring, there was an effect of the maternal diet with a decrease in *Prlr* expression in RD/RD and HD/RD, compared to CONT/RD; and a significant reduction in the expression of *Prlr* in the RD/HD, when compared to CONT/HD. In the expression of *Esr1* there was also a

maternal diet effect, with a decrease in RD/HD, compared to CONT/HD and HD/HD. These hypothalamic differences reinforce previous findings that this area has an important role in the nutrition of the females in the reproductive phase, and to their descendants in the adult life.

Based on our findings, we can affirm that maternal nutrition impacts the expression of *Prlr* and *Esr1*, which are involved in energy metabolism, both peripherally and centrally. Possibly, there are epigenetic mechanisms affecting the gene expression, since the environment and food behavior of the dams went through different manipulations, thus reflecting in the adult life of the offspring, showing a transgenerational transmission of the effects of the maternal diet. However, the intracellular mechanisms by which this happens need to be elucidate by future studies. In summary, nutritional interventions during the reproductive period should be carefully applied, since the impact on the metabolic parameters of the mother can reflect on the health of the offspring.

Acknowledgements

This study was funded by PROAP/UFCSPA, CAPES, and FAPERGS for financial support.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Bakowska JC, Morrell JI (1997) Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *The Journal of Comparative Neurology* 386:161–177.
2. Bale TL (2015) Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. *Nature Reviews Neuroscience* 16:332–344. doi: 10.1038/nrn3818

3. Ben-Jonathan N, Hugo ER, Brandebourg TD, Lapensee CR (2006) Focus on prolactin as a metabolic hormone. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 17:110–116. doi: 10.1016/j.tem.2006.02.005
4. Ben-Jonathan N, Hugo E (2014) Prolactin (PRL) in Adipose Tissue: Regulation and Functions. *Advances in Experimental Medicine and Biology Recent Advances in Prolactin Research* 1–35. doi: 10.1007/978-3-319-12114-7_1
5. Benson DA, Clark K, Karsch-Mizrachi I, et al (2013) GenBank. *Nucleic Acids Research*. doi: 10.1093/nar/gkt1030
6. Bernardis LL, Patterson BD (1968) Correlation Between 'lee Index' And Carcass Fat Content In Weanling And Adult Female Rats With Hypothalamic Lesions. *Journal of Endocrinology* 40:527–528. doi: 10.1677/joe.0.0400527
7. Best D, Avenell A, Bhattacharya S (2017) How effective are weight-loss interventions for improving fertility in women and men who are overweight or obese? A systematic review and meta-analysis of the evidence. *Human Reproduction Update* 23:681–705. doi: 10.1093/humupd/dmx027
8. Breier B, Vickers M, Ikenasio B, et al (2001) Fetal programming of appetite and obesity. *Molecular and Cellular Endocrinology* 185:73–79. doi: 10.1016/s0303-7207(01)00634-7
9. Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR (2010) Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *The Journal of Comparative Neurology* 518:92–102. doi: 10.1002/cne.22208
10. Buntin JD, Hnasko RM, Zuzick PH (1999) Role of the Ventromedial Hypothalamus in Prolactin-Induced Hyperphagia in Ring Doves. *Physiology & Behavior* 66:255–261. doi: 10.1016/s0031-9384(98)00288-1
11. Carré N, Binart N (2014) Prolactin and adipose tissue. *Biochimie* 97:16–21. doi: 10.1016/j.biochi.2013.09.023
12. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al (2004) Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation* 114:1752–1761. doi: 10.1172/jci21625
13. Gallardo JM, Gómez-López J, Medina-Bravo P, et al (2015) Maternal obesity increases oxidative stress in the newborn. *Obesity* 23:1650–1654. doi: 10.1002/oby.21159

14. Gerardo-Gettens T, Moore BJ, Stern JS, Horwitz BA (1989) Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1989.256.1.r276
15. Giovenardi M, Consiglio A, Barros H, Lucion A (2000) Pup age and aggressive behavior in lactating rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 33:1083–1088. doi: 10.1590/s0100-879x2000000900015
16. Golbidi S, Daiber A, Korac B, et al (2017) Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. *Current Diabetes Reports*. doi: 10.1007/s11892-017-0951-7
17. Hancock CR, Han D-H, Chen M, et al (2008) High-fat diets cause insulin resistance despite an increase in muscle mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:7815–7820. doi: 10.1073/pnas.0802057105
18. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, et al (2000) Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:12729–12734. doi: 10.1073/pnas.97.23.12729
19. Jacobs S, Teixeira DS, Guilherme C, et al (2014) The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiology & Behavior* 129:280–286. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.03.003
20. Kershaw EE, Flier JS (2004) Adipose Tissue as an Endocrine Organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 89:2548–2556. doi: 10.1210/jc.2004-0395
21. Lapensee CR, Horseman ND, Tso P, et al (2006) The Prolactin-Deficient Mouse Has an Unaltered Metabolic Phenotype. *Endocrinology* 147:4638–4645. doi: 10.1210/en.2006-0487
22. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* 25:402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* 193:265-275
24. Marengo A, Jouness RIK, Bugianesi E (2016) Progression and Natural History of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Adults. *Clinics in Liver Disease* 20:313–324. doi: 10.1016/j.cld.2015.10.010

25. Matsuda M, Shimomura I (2013) Increased oxidative stress in obesity: Implications for metabolic syndrome, diabetes, hypertension, dyslipidemia, atherosclerosis, and cancer. *Obesity Research & Clinical Practice*. doi: 10.1016/j.orcp.2013.05.004
26. Mcmillen IC, Robinson JS (2005) Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiological Reviews* 85:571–633. doi: 10.1152/physrev.00053.2003
27. Moore BJ, Gerardo-Gettens T, Horwitz BA, Stern JS (1986) Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. *Brain Research Bulletin* 17:563–569. doi: 10.1016/0361-9230(86)90226-1
28. Moreno-Castilla C, Mauricio D, Hernandez M (2016) Role of Medical Nutrition Therapy in the Management of Gestational Diabetes Mellitus. *Current Diabetes Reports*. doi: 10.1007/s11892-016-0717-7
29. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, et al (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443:289–295. doi: 10.1038/nature05026
30. Moura ACD, Lazzari VM, Agnes G, et al (2014) Transcriptional expression study in the central nervous system of rats: what gene should be used as internal control? *Einstein (São Paulo)* 12:336–341. doi: 10.1590/s1679-45082014ao3042
31. Mucellini AB, Goularte JF, Ana Carla De Araujo Da Cunha, et al (2013) Effects of exposure to a cafeteria diet during gestation and after weaning on the metabolism and body weight of adult male offspring in rats. *British Journal of Nutrition* 111:1499–1506. doi: 10.1017/s0007114513003838
32. Noel MB, Woodside B (1993) Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. *Physiology & Behavior* 54:151–154. doi: 10.1016/0031-9384(93)90057-m
33. Noeman SA, Hamooda HE, Baalash AA (2011) Biochemical Study of Oxidative Stress Markers in the Liver, Kidney and Heart of High Fat Diet Induced Obesity in Rats. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. doi: 10.1186/1758-5996-3-17
34. Oliva L, Aranda T, Caviola G, et al (2017) In rats fed high-energy diets, taste, rather than fat content, is the key factor increasing food intake: a comparison of a cafeteria and a lipid-supplemented standard diet. *PeerJ*. doi: 10.7717/peerj.3697

35. Pérez-Pérez A, Sánchez-Jiménez F, Maymó J, et al (2015) Role of leptin in female reproduction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. doi: 10.1515/cclm-2014-0387
36. Pi X, Grattan DR (1998b) Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *The Journal of Comparative Neurology* 18;394(4):462-74.
37. Rando OJ, Simmons RA (2015) I'm Eating for Two: Parental Dietary Effects on Offspring Metabolism. *Cell* 161:93–105. doi: 10.1016/j.cell.2015.02.021
38. Ranhotra HS (2010). The estrogen-related receptor alpha: the oldest, yet an energetic orphan with robust biological functions. *Journal of Receptors and Signal Transduction* 30:193–205. doi: 10.3109/10799893.2010.487493
39. Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. *Bioinformatics Methods and Protocols* 132(3):365–386. doi: 10.1385/1-59259-192-2:365
40. Sominsky L, Ziko I, Soch A, et al (2016) Neonatal overfeeding induces early decline of the ovarian reserve: Implications for the role of leptin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 431:24–35. doi: 10.1016/j.mce.2016.05.001
41. Stuebe A, Rich-Edwards J (2008) The Reset Hypothesis: Lactation and Maternal Metabolism. *American Journal of Perinatology* 26:081–088. doi: 10.1055/s-0028-1103034
42. Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS, et al (2000) Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1152/ajpendo.2000.279.1.e8343. Waterson MJ, Horvath TL (2015) Neuronal Regulation of Energy Homeostasis: Beyond the Hypothalamus and Feeding. *Cell Metabolism* 22:962–970. doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.026

FIGURES LEGENDS

Table 1. Primers used for SYBR® Green assays.

Table 2. Serum biochemical parameters such as glucose, triglycerides, total cholesterol, insulin, leptin concentration and Lee index in dams *Balb/c* mice fed with control (CONT), restrictive (RD) and hypercaloric (HD) diets. Data expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ when compared to CONT and RD.

Figure 1. Time (in days) to become pregnant (A), number of newborns per mice (B), weight gain of dams during the pregnancy (C), and the weight gain of the pups evaluated until the 21st postnatal day (D), of the control group (CONT), caloric restriction group (RD), and hypercaloric diet group (HD). Data expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 2. The 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCF) oxidation assay (A), superoxide dismutase (SOD) (B) and catalase (CAT) (C) activities, and SOD/CAT ratio (D) in the adipose tissue of control (CONT), caloric restriction (RD), and hypercaloric diet (HD)-fed dams. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 3. The 2',7'-dihydrodichlorofluorescein (DCF) oxidation assay (A), superoxide dismutase (SOD) (B) and catalase (CAT) (C) activities, and SOD/CAT ratio (D) in the adipose tissue of control group (CONT), caloric restriction group (RD), and hypercaloric diet group (HD) offspring. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ when compared to

CONT/CONT and RD/CONT; CONT/HD and RD/HD. # $p < 0.05$ when compared to CONT/RD.

Figure 4. Gene expression of the *Prlr* (A) and of the *Esr1* (B) in the adipose tissue of control (CONT), caloric restriction (RD) and hypercaloric diet (HD)-fed dams. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

Figure 5. Gene expression of the *Prlr* (A) and of the *Esr1* (B) in the adipose tissue of control (CONT), caloric restriction (RD) and hypercaloric diet (HD)-fed offspring. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ when compared to CONT/RD; & $p < 0.05$ when compared to HD/RD.

Figure 6. Gene expression of the *Prlr* (A) and of the *Esr1* (B) in the hypothalamus of the dams control group (CONT), caloric restriction group (RD) and hypercaloric diet group (HD). Data are expressed as mean \pm SEM compared by the one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ when compared to CONT.

Figure 7. Gene expression of the *Prlr* (A) and of the *Esr1* (B) in the hypothalamus of the control (CONT), caloric restriction (RD) and hypercaloric diet (HD)-fed offspring. Data are expressed as mean \pm SEM compared by the two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. * $p < 0.05$ when compared to CONT/RD; ** $p < 0.05$ when compared to CONT/HD; ## $p < 0.05$ when compared to CONT/HD and HD/HD.

Table 1. Primers sequences used.

Gene	Primer F	Primer R
<i>Prlr</i>	5'GCTTGCTGGGAAGTACGGAA3'	5'TTTCTCCGGATCCGTTTCG3'
<i>Esr1</i>	5'CAAGAACGTTGTGCCCTCT3'	5'TGTAAGGAATGTGCTGAAGT GGA3'
<i>PPIA</i>	5'TATCTGCACTGCCAAGCATGAGT G3'	5'CTTCTTGCTGGTCTTGCCATT CC3'
<i>ActB</i>	5'TATGCCAACACAGTGCTGTCTGG 3'	5'TACTCCTGCTTGCTGATCCAC AT3'

Abbreviations: *Prlr*: prolactin receptor; *Esr1*: alpha estrogen receptor; *PPIA*: peptidylprolyl isomerase A; *ActB*: actin beta.

Table 2. Serum glucose, triglycerides, total cholesterol, insulin, leptin concentration and Lee index in female *Balb/c* mice fed a standard (CONT), restrictive (RD) and hypercaloric (HD) diets.

	CONT (n= 6-8)	RD (n=6-7)	HD (n= 5-7)
Glucose (mg/dL)	153.2 ± 1.65	140.2 ± 11.04	162.2 ± 7.52
Triglycerides (mg/dL)	116.1 ± 8.1	78.6 ± 5.61	183.1 ± 20.87 *
Total cholesterol (mg/dL)	113.7 ± 7.24	97.30 ± 3.32	107.4 ± 9.45
Insulin (pg/mL)	27.38 ± 7.9	33.94 ± 10.94	15.96 ± 2.82
Leptin (ng/dL)	140.3 ± 23.4	82.3 ± 21.7	326.7 ± 51.9 *
Lee's Index	338.2 ± 6.75	337.0 ± 3.94	328.8 ± 5.84

Data are expressed as mean ± SEM. One-Way analysis of variance followed by Tukey's multiple comparison test. * p<0.05 compared to CONT and RD groups.

Figure 2.

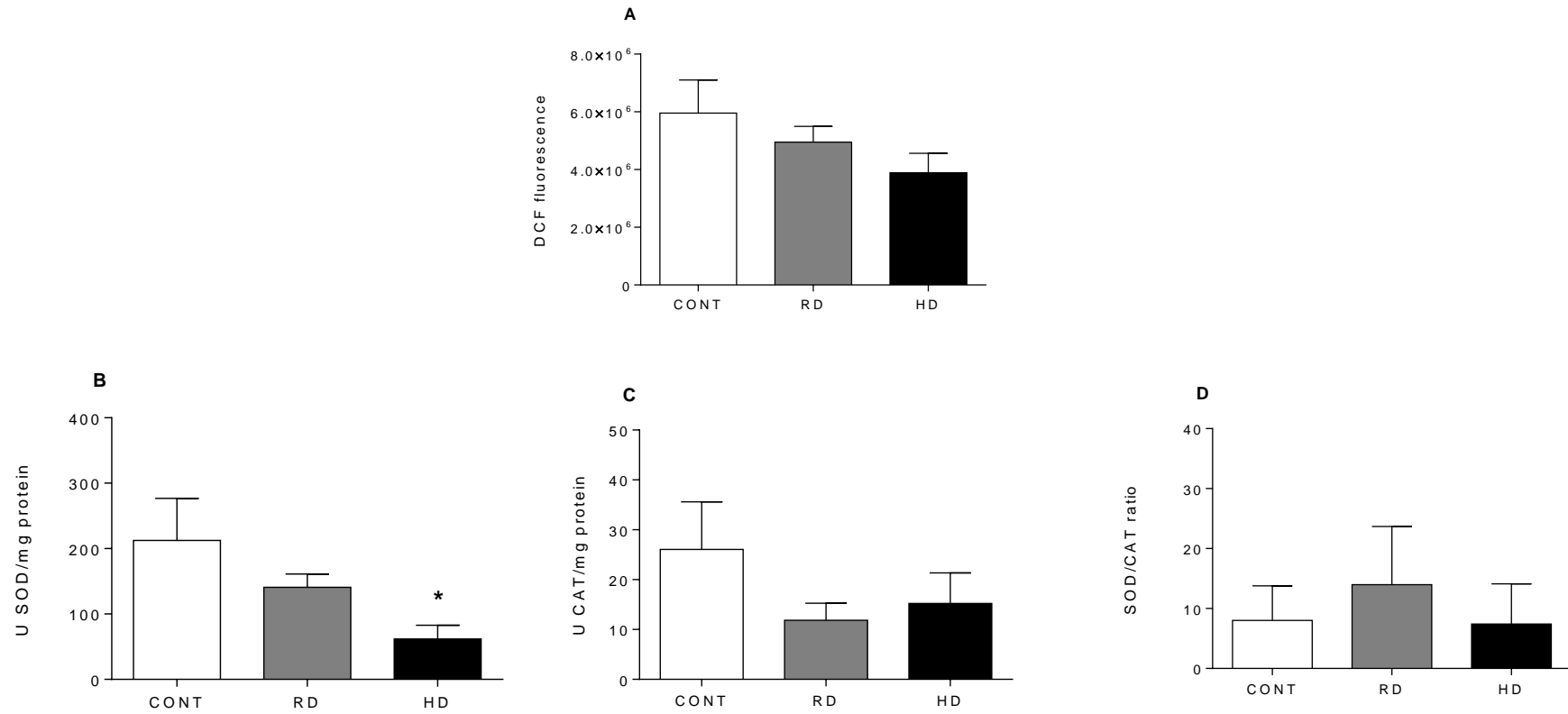


Figure 3.

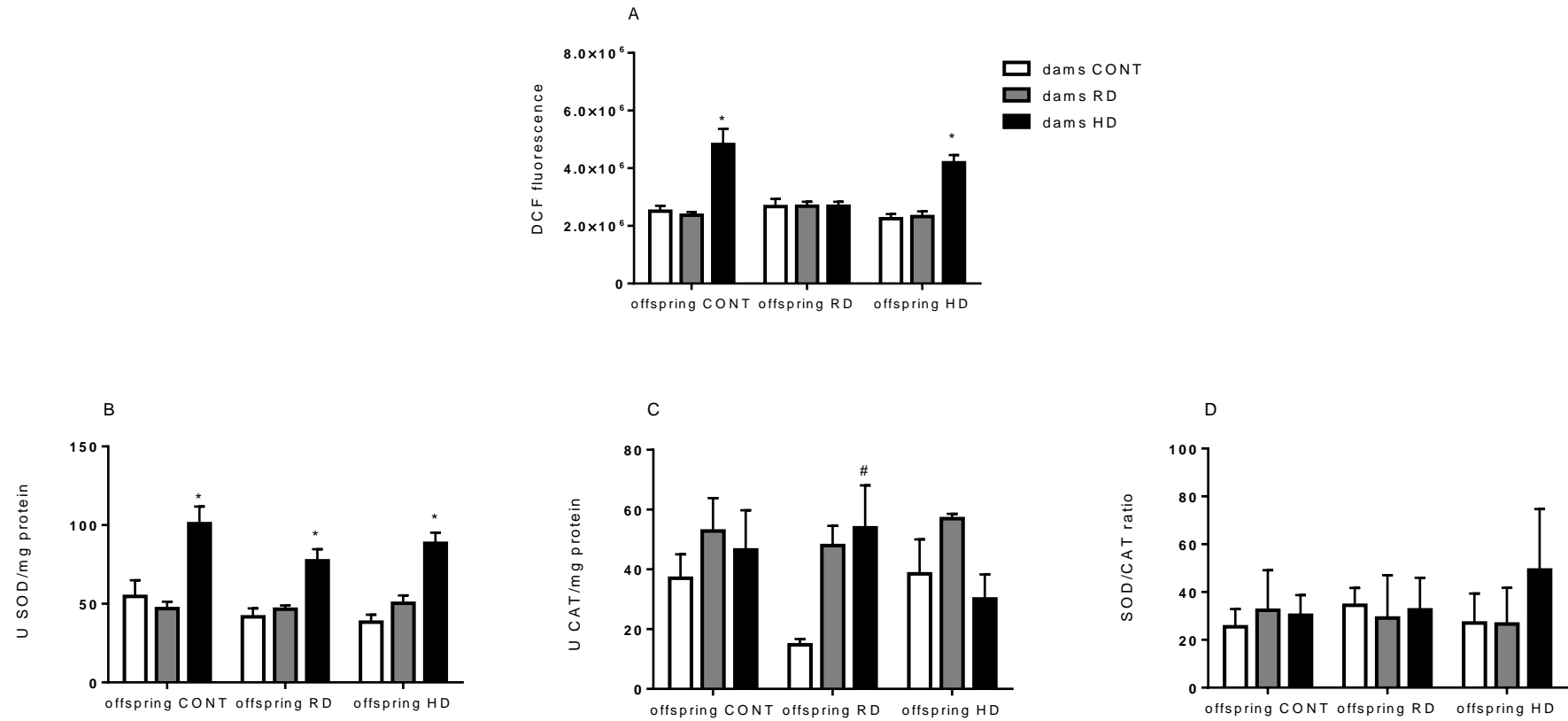


Figure 4.

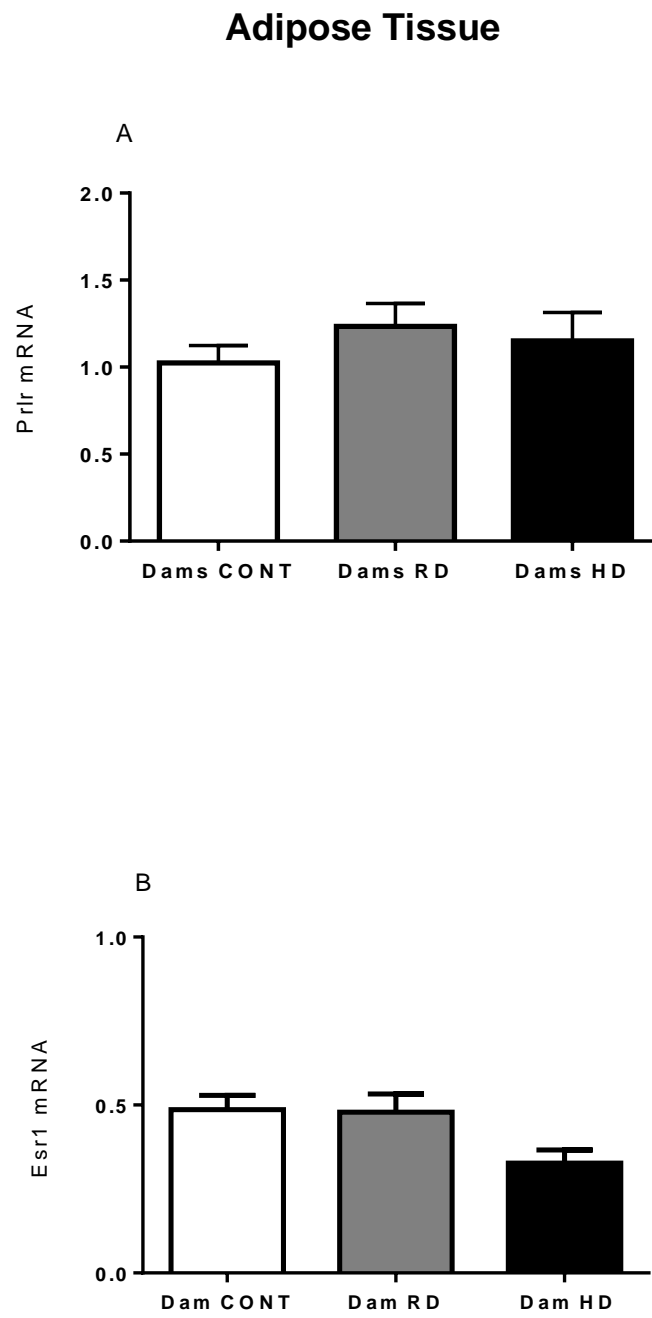


Figure 5.

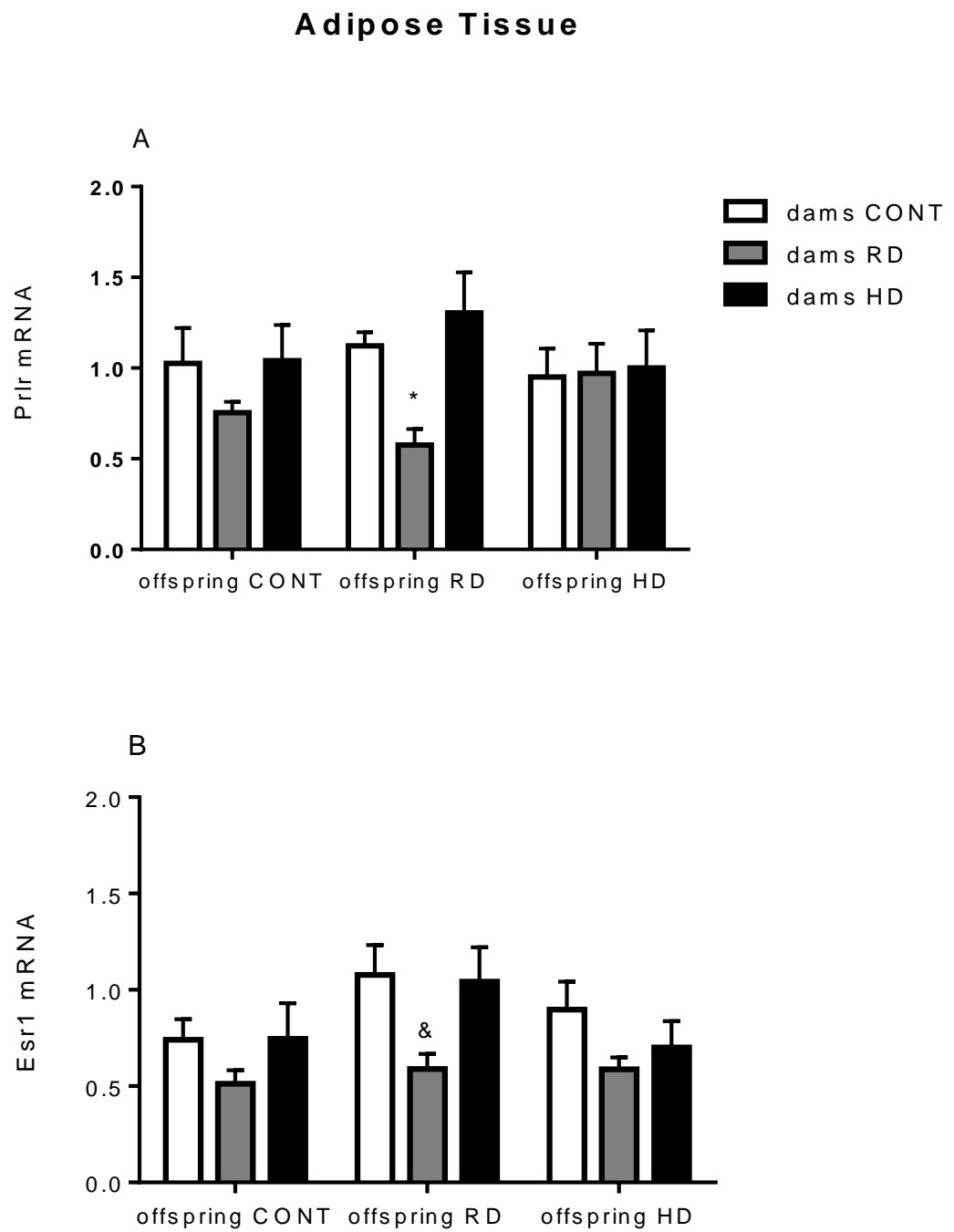


Figure 6.

Hypothalamus

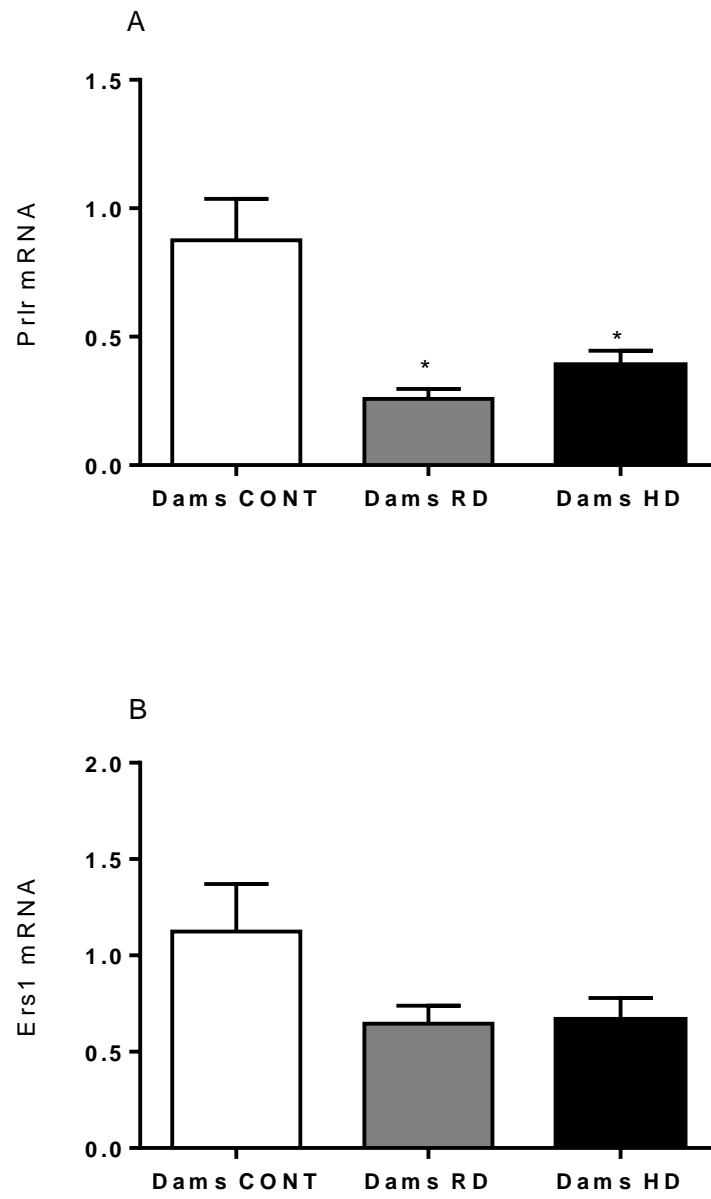
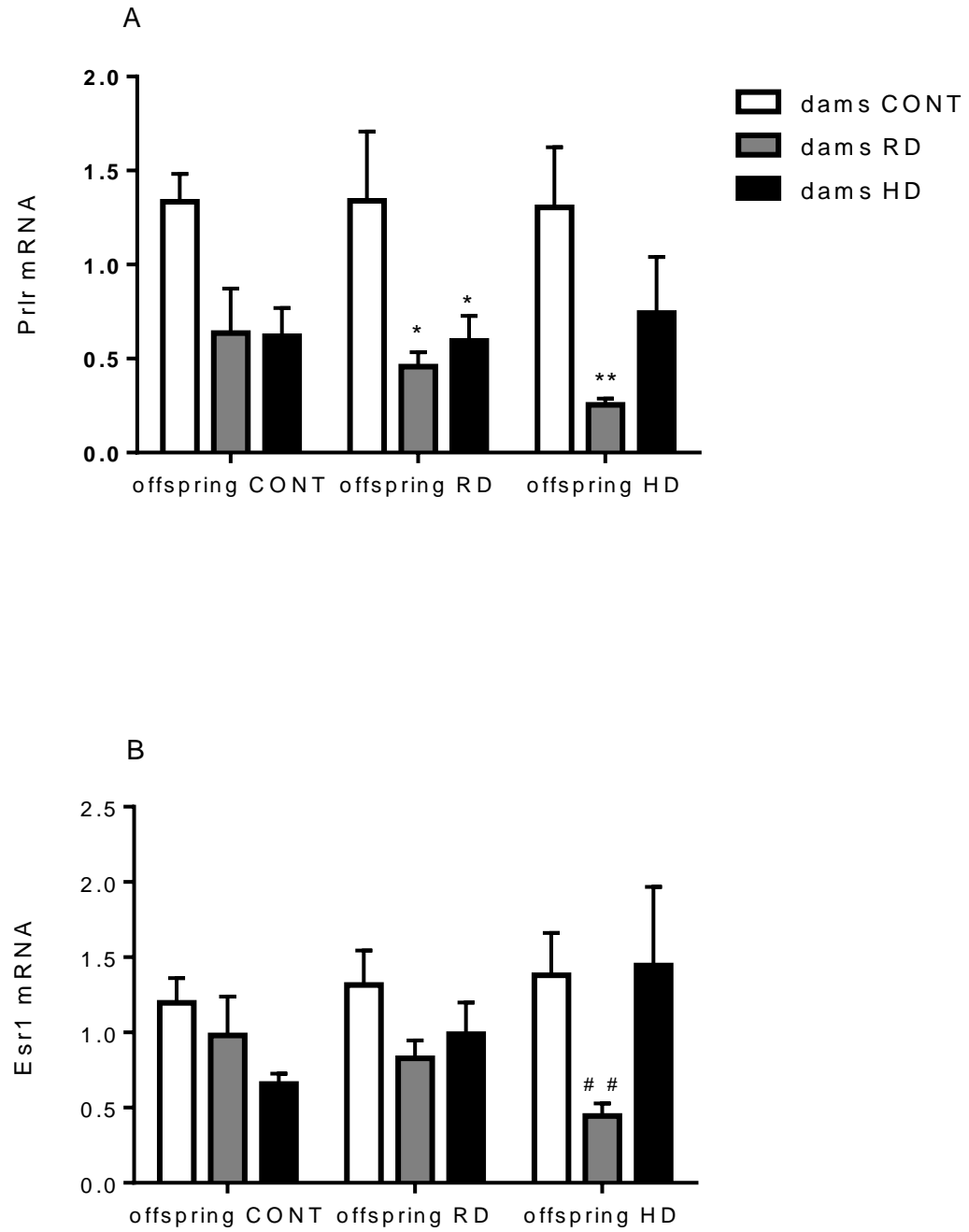


Figure 7.

Hypothalamus



4 DISCUSSÃO

Estudos que avaliem os efeitos de diferentes tipos de dieta materna (restrição calórica e hipercalórica) na saúde da prole, bem como o efeito da dieta que a prole recebe após desmame, ainda são escassos na literatura científica. E, até onde nós sabemos, nossa proposta de descrever os efeitos da restrição calórica e da dieta hipercalórica na expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo e no hipotálamo de genitoras e camundongos machos é pioneira.

Para termos resultados mais robustos e contextualizar com o desfecho encontrado na prole, analisamos o perfil metabólico, o peso corporal e o estresse oxidativo no tecido adiposo das genitoras que receberam dieta CONT, RD ou HD ao longo da gestação e da lactação.

Como esperávamos, encontramos um aumento nos níveis de triglicerídeos e na concentração sérica de leptina nas genitoras que receberam dieta HD, sendo assim observado uma alteração metabólica no tecido adiposo dessas fêmeas. Interessantemente, encontramos menor ganho de peso durante a gestação no grupo HD, isso pode estar relacionado ao período analisado (reprodutivo), caracterizado por ocorrer alterações nas demandas metabólicas quando comparado a roedoras virgens. Quando avaliamos o peso dos filhotes no período da lactação, filhotes de mãe RD apresentaram menor ganho de peso quando comparados ao CONT.

Em relação ao estresse oxidativo no tecido adiposo das genitoras, não observamos diferença entre os grupos quanto a formação de ROS, atividade da CAT e razão SOD/CAT. Todavia, observamos diminuição na atividade da SOD no grupo genitoras HD, o que pode predispor ao estresse oxidativo. Nesse sentido, é importante considerar que o tecido adiposo possui alta concentração de enzimas antioxidantes para gerenciar a alta produção de ROS, o que pode corroborar em não termos observado diferença na formação de ROS e na atividade da CAT.

Quando analisamos a prole, observamos aumento significativo de DCF no grupo HD/CONT e HD/HD. Quanto a atividade da SOD, verificamos aumento significativo nos grupos HD/CONT, HD/RD e HD/HD, bem como atividade da CAT

aumentada no grupo HD/RD. Diante desses resultados, é possível inferir que há um importante efeito da dieta materna (dieta HD) levando ao desequilíbrio oxidativo no tecido adiposo da prole, independente da dieta consumida pelos descendentes ao longo da vida.

Em relação ao efeito da dieta RD e HD na expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo das genitoras, não observamos diferença entre os grupos. Possivelmente, nosso período de intervenção tenha contribuído para este resultado pois a gestação e a lactação são períodos de grande modificação em parâmetros fisiológicos no organismo materno. Entretanto, quando avaliamos o hipotálamo, encontramos menor expressão do *Prlr* tanto no grupo HD quanto no RD, mas nenhuma diferença na expressão gênica do *Esr1*. Na prole, a expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo demonstraram efeito da dieta materna, foi observado uma diminuição significativa na expressão de ambos receptores no grupo RD/RD. Centralmente, a expressão do *Prlr* na prole apresentou significativa diminuição nos grupos RD/RD e RD/HD. Da mesma forma, a expressão do *Esr1* esteve diminuída significativamente no grupo RD/HD no hipotálamo.

Nossos achados exprimem que a dieta exerce diferente impacto na expressão dos receptores estudados quando avaliamos sua expressão a nível central e periférico. Este estudo evidencia, através de novas informações, a importância da dieta materna, uma vez que demonstramos que há efeito das diferentes dietas das genitoras na alteração da expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo e hipotálamo da prole na vida adulta. Possivelmente, esse efeito ocorra por mecanismos epigenéticos por meio da reprogramação fetal. Para elucidarmos melhor os mecanismos envolvidos nessa reprogramação, estudos futuros são necessários.

5 CONCLUSÕES

Em relação às genitoras:

- Foi observado que a dieta hipercalórica alterou os parâmetros metabólicos analisados através do aumento dos níveis de triglicerídeos e leptina;
- As genitoras que receberam dieta hipercalórica apresentaram menor ganho de peso durante a gestação;
- A restrição calórica aumentou o tempo das genitoras para emprenhar e os filhotes ganharam menos peso durante a lactação;
- As diferentes dietas não modificaram os parâmetros de estresse oxidativo no tecido adiposo das genitoras;
- Tanto a restrição calórica quanto a dieta hipercalórica não modificaram a expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo;
- Tanto a restrição calórica quanto a dieta hipercalórica promoveram uma diminuição na expressão gênica do receptor *Prlr* no hipotálamo;
- A restrição calórica e a dieta hipercalórica não impactaram na expressão gênica do receptor *Esr1* no hipotálamo;
- Intervenções nutricionais durante o período reprodutivo devem ser aplicadas de forma criteriosa pois impactos no metabolismo energético das genitoras podem refletir na saúde da prole.

Em relação aos filhotes machos:

- Foi observado um aumento na formação de espécies reativas de oxigênio e na atividade das enzimas SOD e CAT nos filhotes oriundos de fêmeas que receberam dieta hipercalórica;
- A associação da dieta de restrição calórica materna com a dieta de restrição calórica dos filhotes ao longo da vida promoveu uma diminuição na expressão gênica dos receptores *Prlr* e *Esr1* no tecido adiposo;
- A prole de genitoras alimentadas com dieta de restrição calórica, independentemente da dieta recebida ao longo da vida, apresentaram menor expressão gênica do *Prlr* no hipotálamo;

- A dieta de restrição calórica da genitora associada à dieta hipercalórica da prole após o desmame impactou na redução da expressão gênica do receptor *Esr1* no hipotálamo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIN, R.; *et al.* A prolactin family paralog regulates reproductive adaptations to a physiological stressor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 47, p. 16543–16548, 2004.

AINGE, H.; *et al.* A systematic review on animal models of maternal high fat feeding and offspring glycaemic control and adiposity. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 3, p. 325–35, 2010.

BALE, T. L.; *et al.* Early life programming and neurodevelopmental disorders. **Biological Psychiatry**, v. 68, n. 4, p. 314–319, 2010.

BALE, T. L.; Epigenetic and transgenerational reprogramming of brain development. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 16, n. 6, p. 332–344, 2015.

BAKOWSKA, J. C.; MORRELL, J. L. Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 386, n. 2, p. 161–177, 1997.

BARBER, M. C.; *et al.* The role of growth hormone, prolactin and insulin-like growth factors in the regulation of rat mammary gland and adipose tissue metabolism during lactation. **Journal of Endocrinology**, v. 135, n. 2, p. 195–202, 1992.

BARJA, G. Aging in vertebrates, and the effect of caloric restriction: a mitochondrial free radical production DNA damage mechanism? **Biological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 235–251, 2004.

BEGG, D. P.; WOODS, S. C. The endocrinology of food intake. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 9, n. 10, p. 584–597, 2013.

BEN-JONATHAN, N.; *et al.* Focus on prolactin as a metabolic hormone. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 17, n. 3, p. 110–116, 2006.

BEN-JONATHAN, N.; LAPENSEE, C.R.; LAPENSEE, E. W. What can we learn from rodents about prolactin in humans? **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1–41, 2007.

BEN-JONATHAN, N.; HUGO, E. Prolactin (PRL) in adipose tissue: regulation and functions. **Advances in Experimental Medicine and Biology Recent Advances in Prolactin Research**, p. 1–35, 2014.

BETTERIDGE, D. J. What is oxidative stress? **Metabolism**, v. 49, n. 2, p. 3–8, 2000.

BINART, N. Prolactin. **The pituitary**, p. 129 – 161, 2017.

BRANDEBOURG, T. D.; BOWN, J. L.; BEN-JONATHAN, N. Prolactin upregulates its receptors and inhibits lipolysis and leptin release in male rat adipose tissue. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 357, n. 2, p. 408–413, 2007.

BROWN, R. S.; *et al.*, Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 518, n. 1, p. 92–102, 2010.

BUNTIN, J. D.; HNASKO, R. M.; ZUZICK, P. H. Role of the ventromedial hypothalamus in prolactin-induced hyperphagia in ring doves. *Physiology & Behavior*, v. 66, n. 2, p. 255–261, 1999.

BUONFIGLIO, D. C.; *et al.* Obesity impairs lactation performance in mice by inducing prolactin resistance. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

CARRÉ, N.; BINART, N. Prolactin and adipose tissue. **Biochimie**, v. 97, p. 16–21, 2014.

CARRETERO, J.; *et al.* Prolactin system in the hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 375, n. 1, p. 193–199, 2018.

DEVARAJ, S.; JIALAL, I. Alpha-Tocopherol decreases tumor necrosis factor-alpha mRNA and protein from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 38, n. 9, p. 1212–1220, 2005.

FONTANA, L.; PARTRIDGE, L.; LONGO, V. D. Extending healthy life span – From yeast to humans. **Science**, v. 328, n. 5976, p. 321–326, 2010.

FRANK, A.; BROWN, L. M.; CLEGG, D. J. The role of hypothalamic estrogen receptors in metabolic regulation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 35, n. 4, p. 550–557, 2014.

FREEMAN, M. E.; *et al.* Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 4, p. 1523–1631, 2000.

FREEMARK, M.; *et al.* Targeted deletion of the PRL receptor: Effects on islet development, insulin production, and glucose tolerance. **Endocrinology**, v. 143, n. 4, p. 1378–1385, 2002.

FUENTE-MARTÍN, E.; *et al.* Hypothalamic inflammation without astrogliosis in response to high sucrose intake is modulated by neonatal nutrition in male rats. **Endocrinology**, v. 154, n. 7, p. 2318–2330, 2013.

FUNSTON, R. N.; LARSON, D. M.; VONNAHME, K. A. Effects of maternal nutrition on conceptus growth and offspring performance: Implications for beef cattle production. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. suppl.13, 2010.

GALLARDO, J. M.; *et al.* Maternal obesity increases oxidative stress in the newborn. **Obesity**, v. 23, n. 8, p. 1650–1654, 2015.

GAO, Q.; HORVATH, T. L. Neuronal control of energy homeostasis. **FEBS Letters**, v. 582, n. 1, p. 132–141, 2007.

GENARO P. S.; SARKIS K. S.; MARTINI L. A. O efeito da restrição calórica na longevidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 5, p. 667–672, 2009.

- GERARDO-GETTENS, T.; *et al.* Prolactin stimulates food intake in a dose-dependent manner. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 256, n. 1, 1989.
- GÓES, C. P.; SAUCE, B.; PERIPATO, A. C. Milk ejection in mice LG/J x SM/J. **Mammalian Genome**, v. 23, n. 11-12, p. 770–779, 2012.
- GONZÁLEZ-GARCÍA, I.; *et al.* Hypothalamic lipids: key regulators of whole body energy balance. **Neuroendocrinology**, v. 104, n. 4, p. 398–411, 2016.
- GRATTAN, D. R.; 60 years of neuroendocrinology: The hypothalamo-prolactin axis. **Journal of Endocrinology**, v. 226, n. 2, 2015.
- GREDILLA, R.; BARJA, G. Minireview: The role of oxidative stress in relation to caloric restriction and longevity. **Endocrinology**, v. 146, n. 9, p. 3713–3717, 2005.
- GUELHO, D.; *et al.* Prolactina e metabolismo – uma perspectiva diferente de uma hormona multifuncional. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 11, n. 2, p. 268–276, 2016.
- GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Guyton & Hall: Tratado de fisiologia médica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 5, p. 1147–1150, 2007.
- HEINE, P. A.; *et al.* Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 23, p. 12729–12734, 2000.
- HERNANDEZ, L. L.; *et al.* High fat diet alters lactation outcomes: possible involvement of inflammatory and serotonergic pathways. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.
- HORVATH, T. L.; *et al.* Synaptic input organization of the melanocortin system predicts diet-induced hypothalamic reactive gliosis and obesity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 33, p. 14875–14880, 2010.
- KARAOUZENE, N.; *et al.* Effects of the association of aging and obesity on lipids, lipoproteins and oxidative stress biomarkers: A comparison of older with young men. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 10, p. 792–799, 2011.
- KARNANI, M.; BURDAKOV, D. Multiple hypothalamic circuits sense and regulate glucose levels. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 300, n. 1, 2011.
- KAUR, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. **Cardiology Research and Practice**, v. 2014, p. 1–21, 2014.
- KRINSKY, N. I.; JOHNSON, E. J. Carotenoid actions and their relation to health and disease. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 26, n. 6, p. 459–516, 2005.

LADYMAN, S. R.; AUGUSTINE, R. A.; GRATTAN, D. R. Hormone interactions regulating energy balance during pregnancy. **Journal of Neuroendocrinology**, v.22, n. 7, p. 805–817, 2010.

LAM, T. K.; *et al.* Hypothalamic sensing of circulating fatty acids is required for glucose homeostasis. **Nature Medicine**, v. 11, n. 3, p. 320–327, 2005.

LAPENSEE, C. R.; *et al.* The prolactin-deficient mouse has an unaltered metabolic phenotype. **Endocrinology**, v. 147, n. 10, p. 4638–4645, 2006.

LEITE, E. L.; *et al.* Influência do uso continuado de fluoxetina nas dosagens séricas de prolactina em mulheres. **RBAC**, v. 39, n. 4, p. 283–285, 2007

LING, C. Prolactin (PRL) Receptor gene expression in mouse adipose tissue: increases during lactation and in PRL-Transgenic mice. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3564–3572, 2000.

LING, C.; *et al.* Identification of functional prolactin (PRL) receptor gene expression: PRL inhibits lipoprotein lipase activity in human white adipose tissue. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 88, n. 4, p. 1804–1808, 2003.

LIZARBE, B.; *et al.* High-fat diet consumption alters energy metabolism in the mouse hypothalamus. **International Journal of Obesity**, v. 43, n. 6, p. 1295–1304, 2018.

LONGO, V. D; FINCH, C. E. Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? **Science**, v. 299, n. 5611, p. 1342–1346, 2003.

LÓPEZ-ALARCÓN, C.; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013.

LÓPEZ-LLUCH, G.; NAVAS, P. Calorie restriction as an intervention in ageing. **The Journal of Physiology**, v. 594, n. 8, p. 2043–2060, 2016.

LÓPEZ, M.; *et al.* Energy balance regulation by thyroid hormones at central level. **Trends in Molecular Medicine**, v. 19, n. 7, p. 418–427, 2013.

MARANO, R. J.; BEN-JONATHAN, N. Minireview: extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. **Molecular Endocrinology**, v. 28, n. 5, p. 622–633, 2014.

MATHIAS, P. C. F.; *et al.* Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. **European Journal of Nutrition**, v. 53, n. 3, p. 711–722, 2014.

MELO, A. S. De O.; *et al.* Estado nutricional materno, ganho de peso gestacional e peso ao nascer. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 10, n. 2, p. 249–257, 2007.

MERCHENTHALER, I.; *et al.* Distribution of estrogen receptor alpha and beta in the mouse central nervous system: in vivo autoradiographic and immunocytochemical analyses. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 473, n. 2, p. 270–291, 2004.

- MEYRE, D.; *et al.* Genome-wide association study for early-onset and morbid adult obesity identifies three new risk loci in European populations. **Nature Genetics**, v. 41, n. 2, p. 157–159, 2009.
- MOORE, B. J.; *et al.* Hyperprolactinemia stimulates food intake in the female rat. **Brain Research Bulletin**, v. 17, n. 4, p. 563–569, 1986.
- MORENO-CASTILLA, C.; MAURICIO, D.; HERNANDEZ, M. Role of medical nutrition therapy in the management of gestational diabetes mellitus. **Current Diabetes Reports**, v. 16, n. 4, 2016.
- MORTON, G. J.; *et al.* Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289–295, 2006.
- MUSATOV, S.; *et al.* Silencing of estrogen receptor in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 7, p. 2501–2506, 2007.
- MUTHULAKSHMI, S.; SARAVANAN, R. Protective effects of azelaic acid against high-fat diet- induced oxidative stress in liver, kidney, and heart of C57BL/6J mice. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 377, n. 1-2, p 23–33, 2013.
- MUTINATI, M.; *et al.* Oxidative Stress During Pregnancy In The Sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 3, p. 353–357, 2013.
- NALIATO, E. C. De O.; *et al.* Bone density in women with prolactinoma treated with dopamine agonists. **Pituitary**, v. 11, n. 1, p. 21–28, 2007.
- NILSSON, L. A.; *et al.* Prolactin suppresses malonyl-coa concentration in human adipose tissue. **Hormone and Metabolic Research**, v. 41, n. 10, p. 747–751, 2009.
- NILSSON, L.; *et al.* A common variant near the PRL gene is associated with increased adiposity in males. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 102, n. 1, p. 78–81, 2011.
- NOEL, M. B.; WOODSIDE, B. Effects of systemic and central prolactin injections on food intake, weight gain, and estrous cyclicity in female rats. **Physiology & Behavior**, v. 54, n. 1, p. 151–154, 1993.
- OH, T. S.; *et al.* Hypothalamic AMP-activated Protein Kinase as a Regulator of Food Intake and Energy Balance. **CNS & Neurological Disorders - Drug Targets**, v. 15, n. 8, p. 896–909, 2016.
- ÖSTERLUND, M.; *et al.* Differential distribution and regulation of estrogen receptor- α and - β mRNA within the female rat brain. **Molecular Brain Research**, vl. 54, n. 1, p. 175–180, 1998.
- PALLAVI, R.; GIORGIO, M.; PELICCI, P. G. Insights into the beneficial effect of caloric/ dietary restriction for a healthy and prolonged life. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 318, 2012.
- PATEL, N. V.; *et al.* Caloric restriction attenuates A β -deposition in Alzheimer transgenic models. **Neurobiology of Aging**, v. 26, n. 7, p. 995–1000, 2005.

PATIL, M. J.; HENRY, M. A.; AKOPIAN, A. N. Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. **Channels**, v. 8, n. 3, p. 193–202, 2014.

PEARCE, S.; *et al.* Prolactin, the prolactin receptor and uncoupling protein abundance and function in adipose tissue during development in young sheep. **Journal of Endocrinology**, v. 184, n. 2, p. 351–359, 2005.

PI, X.; GRATTAN, D. R. Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 394, n. 4, p. 462–474, 1998b.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Rang & Dale Farmacologia**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RANHOTRA, H. S. The estrogen-related receptor alpha: the oldest, yet an energetic orphan with robust biological functions. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 30, n. 4, p. 193–205, 2010.

RANI, V.; *et al.* Oxidative stress and metabolic disorders: Pathogenesis and therapeutic strategies. **Life Sciences**, v. 148, p. 183–193, 2016.

REJITHA, J.; KARTHIAYNI, K. Effect of ascorbic acid supplementation on haemato-biochemical and oxidative stress parameters of crossbred Malabari does during peripartum period. **The International Journal of Science & Technology**, v. 2, n. 6, p. 202–205, 2014.

RÍOS, E. A. De Los; *et al.* Impaired prolactin actions mediate altered offspring metabolism induced by maternal high-fat feeding during lactation. **The FASEB Journal**, v. 32, n. 6, p. 3457–3470, 2018.

ROSS, M. G.; DESAI, M. Developmental programming of appetite/satiety. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 64, n. s1, p. 36–44, 2014.

ROTH, L. W.; POLOTSKY, A. J. Can we live longer by eating less? A review of caloric restriction and longevity. **Maturitas**, v. 71, n. 4, p. 315–319, 2012.

SANGEETA, D. Y.; HALPERIN, J. Reproductive actions of prolactin mediated through short and long receptor isoforms. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, n. 1, p. 400–410, 2014.

SAUVÉ, D.; WOODSIDE, B. Neuroanatomical specificity of prolactin-induced hyperphagia in virgin female rats. **Brain Research**, v. 868, n. 2, p. 306–314, 2000.

SCHNEEBERGER, M.; GOMIS, R.; CLARET, M. Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. **Journal of Endocrinology**, v. 220, n. 2, 2014.

SIES, H.; *et al.* Oxidative Stress: Damage to Intact Cells and Organs. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 311, n. 1152, p. 617–631, 1985.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291–295, 1997.

SIMERLY, R. B.; *et al.* Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain: An in situ hybridization study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 294, n. 1, p. 76–95, 1990.

SIMMONS, R. A.; TEMPLETON, L. J.; GERTZ, S. J. Intrauterine Growth Retardation Leads to the Development of Type 2 Diabetes in the Rat. **Diabetes**, v. 50, n. 10, p. 2279–2286, 2001.

SIMONIAN, S. X.; HERBISON, A. E. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 9, n. 11, p. 803–806, 1997.

SIMPSON, K. A.; MARTIN, Ni. M.; BLOOM, S. R. Hypothalamic regulation of food intake and clinical therapeutic applications. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 2, p. 120–128, 2009.

SOHAL, R. S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, no. 5271, p. 59–63, 1996.

SPEAKMAN, J. R.; MITCHELL, S. E. Caloric restriction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 32, n. 3, p. 159–221, 2011.

STEFANIDIS, A.; *et al.* Hypothalamic control of adipose tissue. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 28, n. 5, p. 685–701, 2014.

SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; OLSSON, K. Endocrinology of milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 241–258, 2005.

SWAMINATHAN, G.; *et al.* Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. **Journal of Endocrinology**, v. 196, n. 2, 2007.

SYMONDS, M. E.; SEBERT, S. P.; BUDGE, H. The impact of diet during early life and its contribution to later disease: critical checkpoints in development and their long-term consequences for metabolic health. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 68, n. 4, p. 416–421, 2009.

SYMONDS, M. E.; *et al.* Prolactin receptor gene expression and fetal adipose tissue. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 10, n. 11, p. 885–890, 1998.

TOVAR, S.; DIÉGUEZ, C. Prolactin and energy homeostasis: pathophysiological mechanisms and therapeutic considerations. **Endocrinology**, v. 155, n. 3, p. 659–662, 2014.

TSUNEDA, P. P.; *et al.* Efeitos da nutrição materna sobre o desenvolvimento e performance reprodutiva da prole de ruminantes. **Revista Investigação**, v. 16, n. 1, p. 56–61, 2017.

VALDEARCOS, M.; *et al.* Microglial inflammatory signaling orchestrates the hypothalamic immune response to dietary excess and mediates obesity susceptibility. **Cell Metabolism**, v. 27, n. 6, p. 1356, 2018.

VELLOSO, L. A.; SCHWARTZ, M. W. Altered hypothalamic function in diet-induced obesity. **International Journal of Obesity**, v. 35, n. 12, p. 1455–1465, 2011.

VOISIN, D. I.; SIMONIAN, S.; HERBISON, A. Identification of estrogen receptor-containing neurons projecting to the rat supraoptic nucleus. **Neuroscience**, v. 78, n. 1, p. 215–228, 1997.

WANG, Z.; M.; *et al.* Adipocytokines and the regulation of lipid metabolism in growth hormone transgenic and calorie-restricted mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 6, p. 2845–2853, 2007.

WAROLIN, J.; *et al.* The relationship of oxidative stress, adiposity and metabolic risk factors in healthy Black and White American youth. **Pediatric Obesity**, vol. 9, no. 1, p. 43–52, 2013.

WATERSON, M. J.; HORVATH, T. L. Neuronal regulation of energy homeostasis: beyond the hypothalamus and feeding. **Cell Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 962–970, 2015.

WATKINS, A. J.; *et al.* Maternal nutrition modifies trophoblast giant cell phenotype and fetal growth in mice. **Reproduction**, v. 149, n. 6, p. 563–575, 2015.

7 ANEXOS

**ANEXO I – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)
Nº 544/17**



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

CEUA –COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA E ENSINO

- 1) PROTOCOLO Nº: 222/17 Parecer 544/17**
- 2) DATA DO PARECER: 13/12/2017**
- 3) TÍTULO DO PROJETO: ANALISAR O PAPEL DA PROLACTINA, COMO UM HORMÔNIO METABÓLICO, EM CAMUNDONGOS MACHOS ADULTOS OB DIFERENTES DIETAS AO LONGO DA VIDA**
- 4) PESQUISADOR RESPONSÁVEL: MÁRCIA GIOVENARDI**

5) RESUMO DO PROJETO:

A dieta materna no período gestacional e lactação tem suma importância tanto no desenvolvimento fetal da prole quanto na saúde do neonato. Há associações entre alteração no ambiente intrauterino, padrões de crescimento e alterações metabólicas na vida adulta. A prolactina é um hormônio de grande importância na lactação e reprodução e, além disto, tem demonstrado um importante papel no metabolismo energético, atuando no pâncreas e no tecido adiposo. O objetivo do estudo é analisar a influência da dieta materna na expressão gênica em camundongos machos que receberam diferentes dietas ao longo da vida. As amostras biológicas estão armazenadas no freezer a -80°C. Será analisada a expressão gênica dos receptores de prolactina e estrógeno alfa no tecido adiposo e hipotálamo, além das proteínas (STAT, AKT, MAPK) que participam da via de sinalização da prolactina no tecido adiposo. O RNA total das amostras será extraído através do método do TRIzol, a análise da expressão dos genes-alvo será realizada por qPCR utilizando-se o corante SYBRTM Green e a análise da quantificação relativa será realizada conforme os resultados dos testes de eficiência de amplificação dos genes, através do método 2 $\Delta\Delta$ -ct.

6) OBJETIVOS DO PROJETO:

Geral:

Analisar a influência da dieta materna na expressão gênica em camundongos machos adultos que receberam diferentes dietas (restrição calórica, normal e hiper calórica) ao longo da vida.

Específicos:

Analisar o efeito de diferentes dietas no peso corporal da prole.

Analisar o efeito de diferentes dietas na expressão gênica dos receptores de prolactina e estrógeno alfa no hipotálamo.



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Analisar o efeito de diferentes dietas na expressão gênica dos receptores de prolactina e estrógeno alfa no tecido adiposo.
Analisar as proteínas (STAT, AKT, MAPK) que participam da via de sinalização da prolactina no tecido adiposo.

7) FINALIDADE DO PROJETO: Ensino Pesquisa

8) ITENS METODOLÓGICOS E ÉTICOS DO PROJETO:

Título Adequado Comentários

Introdução Adequada Comentários

Objetivos Adequados Comentários

Relevância e Justificativa Adequados Comentários

Materiais e Métodos Adequados Comentários

Cronograma para execução da pesquisa Adequado Comentários

Orçamento e fonte financiadora Adequados Comentários

Referências Bibliográficas Adequadas Comentários

9) O PROJETO ESTÁ ADEQUADO À LEGISLAÇÃO VIGENTE:

Sim Não

10) INFORMAÇÕES RELATIVAS AOS ANIMAIS:

Grau de dor/estresse: B | C D E

Justifique:

Não se aplica



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Espécie: Não se aplica

Número Amostral: Não se aplica

Redução Amostral: Sim Não

Justifique:

Não se aplica

Substituição de Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira uma nova metodologia:

Aprimoramento da Metodologia: Sim Não

Se achar necessário, justifique e sugira aprimoramentos da metodologia:

Acomodação e manutenção dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Não se aplica

Manipulação dos animais: Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias:

Não se aplica

Analgesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com analgésico substituto:

Não se aplica

Anestesia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com anestésico substituto:

Não se aplica

Eutanásia dos animais (se aplicável): Adequada Inadequada



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

Se achar inadequada cite abaixo as melhorias necessárias com metodologia substituta:

Não se aplica

Local de Realização (Biotério/Laboratório): Laboratório de Fisiologia Comportamental e Metabólica e Laboratório de Biologia Molecular
Outra instituição? Qual?

11) CRONOGRAMA DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS

Data	Espécie	Sexo	Quantidade
------	---------	------	------------

12) RECOMENDAÇÃO:

- Aprovado
 Com Pendência
 Não aprovado

Data de Término 01/08/2019

Comentários gerais sobre o projeto:

- O presente projeto irá utilizar tecidos já coletados no projeto "Análise comportamental, bioquímica e epigenética do efeito da nutrição materna em modelo animal" que foi anteriormente aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da UFCSPA sob parecer **368/15**.

- No Formulário unificado para solicitação de autorização para uso de animais em experimentação, assim como no corpo do projeto, o número do parecer da CEUA está equivocado.

8 CURRÍCULO LATTES



Mariana Fraga Gauthier

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1442445366859265>

ID Lattes: **1442445366859265**

Última atualização do currículo em 25/06/2019


Biomédica formada pela Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre UFCSPA (2016). Possui habilitação nas áreas de análises clínicas, genética e imunologia. Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Biociências da UFCSPA. Pós-Graduada em Acupuntura e Eletroacupuntura pelo Colégio Brasileiro de Acupuntura e Medicina Chinesa ABACO/CBA. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Mariana Fraga Gauthier
Nome em citações bibliográficas	GAUTHIER, M. F.
Lattes iD	 http://lattes.cnpq.br/1442445366859265

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2017	Mestrado em andamento em BIOCÊNCIAS (Conceito CAPES 4). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Efeito da dieta materna sobre estresse oxidativo e expressão gênica do receptor de prolactina e estrógeno alfa no tecido adiposo e hipotálamo da prole, Orientador:  Márcia Giovenardi. Coorientador: Silvana de Almeida. Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil. Grande área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Fisiologia / Subárea: Fisiologia de Órgãos e Sistemas / Especialidade: Fisiologia Endócrina.
2019	Especialização em andamento em Acupuntura e Eletroacupuntura. (Carga Horária: 1200h). Colégio Brasileiro de Acupuntura e Medicina Chinesa, ABACO CBA, Brasil.
2012 - 2016	Graduação em Biomedicina. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil. Título: Avaliação dos níveis de cortisol, interleucina 4, interleucina 6 e interferon gama em indivíduos esquizofrênicos após 3 meses de treinamento físico. Orientador: Alessandra Peres.

Formação Complementar

2018 - 2019	Cultura Express High Resolution. (Carga horária: 90h). Cultura Inglesa, CULTURA INGLESA, Brasil.
2017 - 2017	Simposio de Biossegurança e Descartes de Produtos Químicos Perigosos.... (Carga horária: 8h). Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, MEDICINA USP, Brasil.
2017 - 2017	Curso de Combate ao Aedes aegypti e Doenças Correlacionadas. (Carga horária: 22h). Núcleo de Telessaúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, TELESSAÚDERS- UF, Brasil.
2017 - 2017	Vigilância, prevenção, atenção e controle da leishmaniose visceral. (Carga horária: 30h). Universidade Aberta do SUS, UNA-SUS, Brasil.
2017 - 2017	Introdução à Avaliação em Saúde. (Carga horária: 60h). Universidade Aberta do SUS, UNA-SUS, Brasil.
2017 - 2017	Prevenção ao câncer de mama. (Carga horária: 12h). SESI - Departamento Regional do Estado do Paraná, SESI/PR, Brasil.
2017 - 2017	Workshop de Sistemas de Saúde. (Carga horária: 8h). Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, MEDICINA USP, Brasil.
2017 - 2017	Qualidade de vida. (Carga horária: 8h). SESI - Departamento Regional do Estado do Paraná, SESI/PR, Brasil.

2015 - 2015	I Simpósio de Genética, Psiquiatria e Saúde Mental da LIPSAM. (Carga horária: 6h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2014 - 2014	Curso de Extensão Sepse: Abordagem Multidisciplinar. (Carga horária: 30h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2014 - 2014	Museu de Anatomia da UFCSPA. (Carga horária: 30h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2013 - 2013	Monitoria Química Geral e Inorgânica Biomedicina. (Carga horária: 10h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2013 - 2013	Módulo de Primeiros Socorros da UFCSPA. (Carga horária: 8h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.
2013 - 2013	Neurobiologia do sono e sonhos. (Carga horária: 3h). Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Brasil.
2013 - 2013	Aplicação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na produção de cerveja. (Carga horária: 4h). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Brasil.
2013 - 2013	Bases de radio-imuno, utilização de marcadores para Id de focos de infecção. (Carga horária: 3h). Federação das Sociedades de Biologia Experimental, FeSBE, Brasil.
2012 - 2012	Proteger é cuidar. (Carga horária: 4h). Hospital Nossa Senhora da Conceição, GHC, Brasil.
2012 - 2012	Curso de Extensão Cinesiquiatria. (Carga horária: 8h). Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Atuação Profissional

Instituto de Cardiologia do Rio Grande do Sul, IC/FUC, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2015 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20

Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, UFCSPA, Brasil.

Vínculo institucional

2014 - 2014 Vínculo: Bolsista, Enquadramento Funcional: Iniciação científica, Carga horária: 20

Hospital de Clínicas de Porto Alegre, HCPA, Brasil.

Vínculo institucional

2016 - 2016 Vínculo: Estágio Curricular Obrigatório, Enquadramento Funcional: Estagiária, Carga horária: 30
Outras informações Estágio Curricular no Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

GENEX - Instituto de Exames Genéticos, GENEX, Brasil.

Vínculo institucional

2016 - 2016 Vínculo: Estágio Curricular, Enquadramento Funcional: Estagiária Curricular, Carga horária: 30

Projetos de pesquisa

2014 - 2015	Análise do efeito de estatínas sobre fatores envolvidos em vias de sinalização de células-tronco in vitro Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Doutorado: (1) . Integrantes: Mariana Fraga Gauthier - Integrante / Melissa Markoski - Coordenador / Melissa Kristochek da Silva - Integrante. Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.
2014 - 2014	Estudo da interação entre células mesenquimais do estroma e macrófagos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> in vitro Projeto certificado pelo(a) coordenador(a) Pedro Roosevelt Torres Romão em 16/06/2017. Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) . Integrantes: Mariana Fraga Gauthier - Integrante / Pedro Roosevelt Torres Romão - Coordenador. Financiador(es): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - Bolsa.
2012 - 2013	Investigação do sistema purinérgico em linhagens de melanomas Situação: Concluído; Natureza: Pesquisa. Alunos envolvidos: Graduação: (1) / Mestrado acadêmico: (1) / Doutorado: (1) . Integrantes: Mariana Fraga Gauthier - Integrante / Márcia Rosângela Wink - Coordenador / Caroline

Marangon - Integrante / Jéssica Gonçalves - Integrante.
 Financiador(es): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - Bolsa.

Áreas de atuação

1. Grande área: Ciências Biológicas / Área: Biologia Geral / Subárea: Biomedicina.

Idiomas

Português Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.
 Inglês Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Prêmios e títulos

2015 Menção de Empreendedorismo: Melhor Trabalho de Gerenciamento Laboratorial, Disciplina de Gerenciamento Laboratorial - Biomedicina UFCSPA.

Produções

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. ★ GAUTHIER, M. F.; LAVRATTI, C. D.; DORNELES, G. P.; ELSNER, V. R.; PERES, A. . Avaliação dos níveis de cortisol, IL-4, IL-6 e IFN- γ em indivíduos esquizofrênicos após 3 meses de treinamento físico. In: 37ª Semana Científica do HCPA. Pesquisa: crise e resiliência, 2017, Porto Alegre. 37ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre: Clinical & Biomedical Research, 2017. v. 37. p. 12-12.
2. FEISTAUER, V.; Andressa, A. A.; FISCH, J.; GAUTHIER, M. F.; BOLLIS, V. B.; OLIVEIRA, C. K.; ALMEIDA, S.; GIOVENARDI, M. . Avaliação de comportamento de ansiedade, atividade motora e memória de camundongos lactantes submetidas a dietas hipercalórica e de restrição. In: 37ª Semana Científica do HCPA. Pesquisa: crise e resiliência, 2017, Porto Alegre. 37ª Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre: Clinical & Biomedical Research, 2017. v. 37. p. 308-308.
3. GAUTHIER, M. F.; SILVA, M. K.; MARKOSKI, M. M. . Análise do efeito de estatinas sobre fatores envolvidos em vias de sinalização de células-tronco in vitro. In: XIX Salão de Iniciação Científica do Instituto de Cardiologia Fundação Universitária de Cardiologia, 2015, Porto Alegre. XIX Salão de Iniciação Científica do Instituto de Cardiologia Fundação Universitária de Cardiologia (IC/FUC) e V Mostra de Projetos de Metodologia Científica IC/FUC e UFCSPA, 2015. p. 79-79.

Apresentações de Trabalho

1. ★ GAUTHIER, M. F.; MOURA, A. C.; FEISTAUER, V.; FISCH, J.; Andressa, A. A.; ALMEIDA, S.; GIOVENARDI, M. . Dieta materna influencia a expressão gênica do receptor de prolactina no tecido adiposo da prole. 2018. (Apresentação de Trabalho/Outra).
2. ★ GAUTHIER, M. F.; LAVRATTI, C. D.; DORNELES, G. P.; ELSNER, V. R.; PERES, A. . Avaliação dos níveis de cortisol, IL-4, IL-6 e IFN- γ em indivíduos esquizofrênicos após 3 meses de treinamento físico. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).
3. GAUTHIER, M. F.; SILVA, M. K.; MARKOSKI, M. M. . Análise do efeito de estatinas sobre fatores envolvidos em vias de sinalização de células-tronco in vitro. 2015. (Apresentação de Trabalho/Outra).
4. GAUTHIER, M. F.; ENGSTER, E. C.; ALMEIDA, P. S.; PERES, A.; PROPHIRO, J. S.; ROMÃO, P.R. . Células-tronco mesenquimais modulam a atividade de macrófagos contra Leishmania e Trypanosoma. 2014. (Apresentação de Trabalho/Outra).
5. GAUTHIER, M. F.; MARANGON, C.; GONCALVES, J.; BUFFON, A.; WINK, M. R. . Investigação do sistema purinérgico em linhagens de melanomas. 2013. (Apresentação de Trabalho/Outra).

Bancas

Participação em bancas de comissões julgadoras

Outras participações

1. GAUTHIER, M. F.. IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA. 2018. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.
2. GAUTHIER, M. F.. III Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da UFCSPA. 2017. Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre.

Eventos

Participação em eventos, congressos, exposições e feiras

1. 1º SEMINÁRIO DE INTERNACIONALIZAÇÃO UFCSPA. 2018. (Seminário).
2. III ENCONTRO DO PPG BIOCÊNCIAS DA UFCSPA E ENCONTRO DE PESQUISA EM BIOLOGIA CELULAR. 2018. (Encontro).
3. IV Mostra de Trabalhos de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2018. (Outra).
4. X Oficina de Neurociências - UFRGS. 2018. (Oficina).
5. 37ª Semana Científica do HCPA. Pesquisa: crise e resiliência. 2017. (Outra).
6. II ENCONTRO DO PPG BIOCÊNCIAS DA UFCSPA E ENCONTRO DE PESQUISA EM FISIOLOGIA DO RS. 2017. (Encontro).
7. I Simpósio de Genética, Psiquiatria e Saúde Mental da LIPSAM. 2015. (Simpósio).
8. XIX Salão de Iniciação Científica do IC/FUC. Análise do efeito de estatinas sobre fatores envolvidos em vias de sinalização de células-tronco in vitro. 2015. (Outra).
9. III Semana Acadêmica da UFCSPA 2014. Células-tronco mesenquimais modulam a atividade de macrófagos contra Leishmania e Trypanosoma. 2014. (Outra).
10. Programa de extensão Museu de Anatomia da UFCSPA. 2014. (Exposição).
11. Bases de radio-imunologia, utilização de marcadores para identificação de focos de infecção. 2013. (Outra).
12. II Semana Acadêmica da UFCSPA 2013. Investigação do sistema purinérgico em linhagens de melanomas. 2013. (Outra).
13. I Simpósio de Geriatria da UFCSPA. 2013. (Simpósio).
14. Neurobiologia do sono e dos sonhos. 2013. (Outra).
15. Programa de extensão Feiras de Saúde da UFCSPA. 2013. (Outra).
16. VII Semana Acadêmica Biomedicina UFRGS. 2013. (Outra).
17. XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia- CBTOX 2013. 2013. (Congresso).
18. XXVIII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE. 2013. (Encontro).
19. Campanha de Vacinação contra a Influenza "Proteger é Cuidar". 2012. (Outra).
20. Evento de extensão Cinepsiquiatria- UFCSPA. 2012. (Simpósio).
21. I Semana Acadêmica da UFCSPA 2012. 2012. (Outra).
22. Módulo de Primeiros Socorros da Liga do Trauma da UFCSPA. 2012. (Oficina).
23. Programa de extensão Feiras de Saúde da UFCSPA. 2012. (Outra).
24. Programa de extensão Feiras de Saúde da UFCSPA. 2011. (Outra).