

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CÍNTIA ONOFRA DE NOVAIS

**OBESIDADE MATERNA INDUZ COMPORTAMENTO SEMELHANTE AO
AUTISMO, ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS, SINÁPTICAS E
NEUROINFLAMATÓRIAS EM DESCENDENTES MACHOS**

Alfenas / MG

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CÍNTIA ONOFRA DE NOVAIS

**OBESIDADE MATERNA INDUZ COMPORTAMENTO SEMELHANTE
AO AUTISMO, ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS, SINÁPTICAS E
NEUROINFLAMATÓRIAS EM DESCENDENTES MACHOS**

Tese de Doutorado apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas pelo Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas na Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva

Co-orientadora: Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti

Alfenas / MG

2023

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Novais, Cíntia Onofra de.

Obesidade materna induz comportamento semelhante ao autismo, alterações epigenéticas, sinápticas e neuroinflamatórias em descendentes machos / Cíntia Onofra de Novais. - Alfenas, MG, 2023.

109 f. : il. -

Orientador(a): Alexandre Giusti Paiva.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Redução da ninhada. 2. Programação perinatal. 3. Rest. 4. Sinapse. 5. Astrócitos. I. Giusti Paiva, Alexandre , orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

CÍNTIA ONOFRA DE NOVAIS

OBESIDADE MATERNA INDUZ COMPORTAMENTO SEMELHANTE AO AUTISMO, ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS, SINÁPTICAS E NEUROINFLAMATÓRIAS EM DESCENDENTES MACHOS

A Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências Fisiológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Aprovada em: 05 de Julho de 2023.

Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela Giusti
Presidente da Banca Examinadora
Instituição: Centro de Inovação e Ensaio Pré-Clínicos
CIEnP
Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Instituição: Universidade de Taubaté
UNITAU
Prof. Dr. Diogo Antônio Alves de Vasconcelos
Instituição: Universidade Federal de Pernambuco
UFPE
Profa. Dra. Maria Martha Bernardi
Instituição: Universidade Paulista
UNIP
Prof. Dr. Tayllon dos Anjos Garcia
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Fabiana Cardoso Vilela Giusti, Usuário Externo**, em 13/07/2023, às 14:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1023621** e o código CRC **A750708D**.

Dedico a Deus, ao meu Mestre, aos meus pais e irmãos, ao meu noivo, aos meus orientadores e aos meus amigos pelo apoio na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de conhecimento e evolução diária e ao seu filho Jesus Cristo pelos exemplos de bondade e sabedoria.

Ao meu Mestre Dr. Celso Charuri por me apresentar os Princípios que me norteiam para construção para um Mundo Bem Melhor.

Aos meus pais Antônio e Lourdes pela oportunidade de vida, pelos ensinamentos e pelo colo amigo sempre que necessário.

Aos meus irmãos, em especial ao Rodrigo que desde pequena me incentivava a estudar e a quem eu admiro.

Ao meu noivo Kênon pelo companheirismo e que apesar de ter pego este processo na reta final, soube me apoiar quando necessário.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre Guisti Paiva por fazer sempre o que era necessário para que eu continuasse e finalizasse a pós-graduação.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Fabiana Cardoso Vilela, pela ocupação em formar excelentes profissionais.

Aos amigos que a pós-graduação me presenteou, Dr. Fernando Vitor Vieira, Dra. Viviana Carolina Trufillo Rojas e a Dra. Bárbara Garcia Ferri pela ajuda em diversos estágios deste trabalho e acima de tudo pelos momentos únicos e felizes que passamos juntos, principalmente na companhia de uma xícara de café e lágrimas.

Aos meus amigos da Pró-Vida pela companhia rumo ao mesmo ideal, pois juntos somos mais fortes.

Ao professor Rodrigo Augusto da Silva (Unip), pela ajuda na execução dos experimentos de epigenética, pela generosidade, disponibilidade, e por compartilhar sua experiência e tempo.

Ao professor Lucas Cezar Pinheiro (UFSC), pelos ensinamentos e pela energia contagiante no tempo em que convivemos na UNIFAL.

À secretária local do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, Adriana Aparecida Pereira pelo carinho e a disposição a me ajudar.

Ao técnico José Reis pela dedicação e cuidado com os animais, tornando possível a realização deste trabalho.

Aos animais que sem eles esse trabalho não poderia ser desenvolvido e aos quais me dediquei com muito carinho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“[...] se você também pretende um Mundo Melhor, saiba que o trabalho é um trabalho de cada um dentro de si.”

(CHARURI, 2008, p. 126-127)

RESUMO

A obesidade é uma doença metabólica crônica que está associada ao desenvolvimento de várias comorbidades. Estudos vêm demonstrando a relação entre a obesidade materna e prejuízos no neurodesenvolvimento dos descendentes, sendo que um dos transtornos do neurodesenvolvimento mais comum é o transtorno do espectro autista (TEA), porém, os mecanismos associados com essas alterações ainda não foram elucidados. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar os mecanismos epigenéticos, neuroplásticos, sinápticos e astrogliais associados com os sintomas semelhantes ao autismo decorrentes da obesidade materna em filhotes machos. Para isso, utilizamos o modelo de obesidade materna por redução de ninhada onde a ninhada normal (NN - 12 filhotes) e a ninhada reduzida (NR - 4 filhotes) em ratos Wistar. O acompanhamento do peso, índice de *Lee* e peso de gorduras da mãe e da prole foram realizados para caracterização da obesidade materna. A prole foi avaliada durante o período juvenil (PND28 - PND32) para caracterizar os sintomas semelhantes ao autismo. Ao final dos testes comportamentais, os animais foram eutanasiados e as estruturas encefálicas córtex pré-frontal e hipocampo foram dissecadas para avaliar marcadores epigenéticos (Line-1, Rest, TETs e DNMTs), e para avaliar a expressão proteica por Western Blot (WB) proteínas envolvidas na transmissão sináptica (OTR, PSD95 e BDNF) e GFAP, um marcador de astrócito reativo. Resultados: Observamos que as ratas fêmeas criadas em NR-G1 tiveram um aumento no ganho de peso desde a primeira semana de vida e se manteve até a idade adulta, onde foi caracterizada a obesidade com o aumento das gorduras perigonadal e retroperitonal e também pelo aumento do índice de *Lee*. Observamos também que a obesidade materna não foi capaz de alterar o ganho de peso, Índice de *Lee* ou o peso de gorduras dos seus filhotes NR-G2 em idade pré-púbere, porém, alterou parâmetros comportamentais que são utilizados para caracterização do comportamento semelhante ao TEA: redução do tempo de brincadeira e uma maior preferência pelo objeto familiar. Além de alterar mecanismos moleculares. Por WB, observamos um aumento de GFAP e de OTR e uma redução de PSD95 e nos marcadores epigenéticos avaliados, observamos uma alteração na metilação global do DNA através da análise de Line-1, tendo o córtex pré-frontal uma tendência a estar hipermetilado e o hipocampo estava hipometilado, alteração na expressão das enzimas que metilam e que desmetilam o DNA e observamos redução tanto na expressão, quanto na metilação de Rest. Conclusão: A obesidade materna induz comportamento semelhante ao autismo, neuroinflamação, leva a prejuízos sinápticos e alteração na maquinaria epigenética de filhotes machos em idade pré-púbere.

Palavra-chave: redução da ninhada; programação perinatal; Rest; sinapse e astrócitos.

SUMMARY

Obesity is a chronic metabolic disease that is associated with the development of several comorbidities. Studies have demonstrated the relationship between maternal obesity and impairments in the neurodevelopment of offspring, with one of the most common neurodevelopmental disorders being autism spectrum disorder (ASD). However, the mechanisms associated with these changes have not yet been elucidated. Thus, the aim of this study was to investigate the epigenetic, neuroplastic, synaptic, and astroglial mechanisms associated with autism-like symptoms arising from maternal obesity in male pups. For this, we used the model of maternal obesity by litter reduction where the normal litter (NN - 12 pups) and the reduced litter (NR - 4 pups) in Wistar rats. Weight monitoring, *Lee* index and quantification of mother and offspring fat were performed to characterize maternal obesity. The offspring were evaluated during the juvenile period (PND28 - PND32) to characterize autism-like symptoms. At the end of the behavioral tests, the animals were euthanized and the brain structures prefrontal cortex and hippocampus were dissected to evaluate epigenetic markers (Line-1, Rest, TETs and DNMTs), and evaluate protein expression by Western Blot (WB) proteins involved in the synaptic transmission (OTR, PSD95 and BDNF) and GFAP, a reactive astrocyte marker. Results: We observed that female rats reared in NR-G1 had an increase in weight gain from the first week of life and this was maintained until adulthood, where obesity was characterized with an increase in peritonadal and retroperitoneal fat and also by an increase in of the *Lee* index. We also observed that maternal obesity was not able to change the weight gain, *Lee* Index or the amount of fat in their NR-G2 pups at prepubertal age, however, it altered behavioral parameters that are used to characterize behavior similar to that of TEA: reduced playing time and greater preference for the familiar object. In addition to altering molecular mechanisms. By WB, we observed an increase in GFAP and OTR and a reduction in PSD95 and in the evaluated epigenetic markers, we observed a change in global DNA methylation through Line-1 analysis, with the prefrontal cortex having a tendency to be hypermethylated and the hippocampus was hypomethylated, alteration in the expression of the enzymes that methylate and demethylate the DNA and we observed a reduction both in the expression and in the methylation of Rest. Conclusion: Maternal obesity induces autism-like behavior, astrogliosis, leads to synaptic damage and changes in the epigenetic machinery of prepubertal male offspring.

Keywords: litter size reduction; perinatal programming; Rest; synapse and astrocytes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação do modelo de indução de obesidade precoce por redução do tamanho da ninhada.	40
Figura 2 - Representação da diferença física apresentada nos primeiros anos de vida de fêmeas criadas em ninhada reduzida em comparação com as fêmeas criadas em ninhada normal.	41
Figura 3 - Representação da padronização G2, filhos de mães obesas e controle.....	42
Figura 4 - Comportamento social de brincar / interação social.....	43
Figura 5 - Reconhecimento de objetos.....	45
Figura 6 - Avaliação da locomoção espontânea no Campo Aberto.....	45
Figura 7 - Representação esquemática do delineamento experimental.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Efeito da redução do tamanho da ninhada no ganho de peso das fêmeas do grupo G1.....	58
Gráfico 2 - Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre a adiposidade ratas adultas (PND56) do grupo G1	59
Gráfico 3 - Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o índice de <i>Lee</i> de ratas adultas (PND56) do grupo G1	60
Gráfico 4 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o ganho de peso de seus descendentes machos G2.....	61
Gráfico 5 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o peso das gorduras de seus descendentes machos G2....	62
Gráfico 6 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o Índice de <i>Lee</i> de seus descendentes machos G2.....	63
Gráfico 7 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de brincadeira e de interação social de seus descendentes machos G2.	64
Gráfico 8 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance de reconhecimento de objetos de descendentes machos G2.....	65
Gráfico 9 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a atividade locomotora de seus descendentes machos G2.	66
Gráfico 10 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão e metilação do Rest no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes	67
Gráfico 11 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão e metilação do Line-1 no córtex pré-frontal e	

hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere.....	69
Gráfico 12 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão das DNMT1 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere.....	70
Gráfico 13 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão das DNMT3a no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere.....	71
Gráfico 14 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão das DNMT3b no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere.....	72
Gráfico 15 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão da TET1 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.....	73
Gráfico 16 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão da TET2 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.....	74
Gráfico 17 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão da TET3 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.....	75
Gráfico 18 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.	76
Gráfico 19 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.	77

Gráfico 20 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de PSD95 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.	78
Gráfico 21 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de OTR no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificação dos anticorpos utilizados para expressão proteica por Western Blot	50
Tabela 2 - Resumo dos resultados moleculares dos efeitos da obesidade materna induzida por redução de ninhada no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes em comparação aos seus controles.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUTS2	proteína do gene 2 de suscetibilidade ao autismo
BDNF	fator neurotrófico
CCGG	sequência genética de 2 citosinas e 2 guaninas
cDNA	DNA complementar
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CpG	pareamento de citosina e guanina na dupla fita de DNA
DEPC	água ultra pura
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNMT1	DNA-metiltransferase 1
DNMT3a	DNA-metiltransferase 3a
DNMT3b	DNA-metiltransferase 3b
DNMTs	DNA-metiltransferases
ECL	quimiluminescência aprimorada
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EPM	erro padrão da média
G0	geração 0
G1	1ª geração
G2	2ª geração
GD	dia gestacional
gDNA	DNA genômico

GFAP	proteína ácida fibrilar glial
hmeC	CCGG hidroximetilcitosina
HpaII	Haemophilus parainfluenzae. (enzima de Restrição de DNA)
IMC	índice de massa corporal
IR	índice de reconhecimento de objetos
Line-1	Retroelemento
meC	CCGG metiladas
MspI	enzima de Restrição do DNA
NMDA	N-metil D-Aspartato
NN	ninhada normal
NN-G1	grupo criado em ninhada normal
NN-G2	grupo criado por mães do grupo ninhada normal
NR	ninhada reduzida
NR-G1	grupo criado em ninhada reduzida
NR-G2	grupo criado por mães do grupo ninhada reduzida
NRSF	Neuron Restrictive Silencer Factor
NRXN 1	neuroxina 1
OTR	receptor de ocitocina
PBDEs	éteres difenílicos polibromados
PBS	Phosphate-buffered saline
PND	dia pós natal
PSD95	proteína de densidade pós-sináptica 95

q.s.p	quantidade suficiente para
q-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real
Rest	Fator de transcrição de silenciamento do elemento repressor 1
RNA	Ácido Ribonucleico
RNase	Enzima do RNA
SDS	dodecil sulfato de sódio
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
T4-BGT	enzima T4- β -glicosiltransferase
TEA	Transtorno do Espectro Autista
TET1	Tet metilcitosina dioxigenase 1
TET2	Tet metilcitosina dioxigenase 2
TET3	Tet metilcitosina dioxigenase 3
TETs	Tet metilcitosina dioxigenases
TF	tempo explorando o objeto familiar
TN	tempo explorando o objeto novo
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
UDP-Glc	glicose da difosfogluose de uridina

LISTA DE SIMBOLOS

°C	graus Celsius
Ca²⁺	Cálcio
cm	Centímetros
g	Gramas
H₂O	Água
mL	Mililitros
ng	Nanograma
rpm	rotação por minuto
μL	Microlitros
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	JUSTIFICATIVA.....	35
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVO GERAL.....	36
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3.2.1	Caracterização da obesidade – (G1).....	36
3.2.2	Caracterização da obesidade – (G2).....	36
3.2.3	Avaliação comportamental de ratos machos em idade pré-púbere (PND28-32) – (G2).....	37
3.2.4	Avaliação marcadores epigenéticos no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos machos em idade pré-púbere (PND28-32) – (G2).....	37
3.2.5	Avaliação marcadores de astrócito reativo, neurogênicos e sinápticos no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos machos em idade pré- púbere (PND28-32) – (G2).....	37
4	MATERIAIS E MÉTODO.....	38
4.1	ANIMAIS.....	38
4.2	ACASALAMENTO.....	38
4.3	INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE PRECOCE POR REDUÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA – G1.....	39
4.3.1	Redução do tamanho da ninhada	39
4.3.2	Acompanhamento do ganho de peso - G1	40
4.3.3	Índice de <i>Lee</i> e peso do tecido adiposo – G1	41

4.4	PADRONIZAÇÕES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DA SEGUNDA GERAÇÃO – G2	41
4.5	AVALIAÇÃO DOS FILHOTES MACHOS - G2	42
4.5.1	Peso corporal, índice de <i>Lee</i> e peso do tecido adiposo.....	42
4.5.2	Comportamento de brincar.....	43
4.5.3	Reconhecimento de objetos.....	44
4.5.4	Avaliação da locomoção no campo aberto.....	45
4.6	AVALIAÇÃO DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DOS MACHOS G2.....	46
4.6.1	Análise da expressão gênica.....	46
4.6.2	Determinação do estado de metilação do DNA	47
4.7	AVALIAÇÃO DE MARCADORES NEUROINFLAMATÓRIOS, NEUROPLÁSTICOS E SINÁPTICOS POR WESTERN BLOT	49
4.8	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	56
6	RESULTADOS.....	57
6.1	CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE DE RATAS G1.....	57
6.1.1	Avaliação do peso das ratas G1.....	57
6.1.2	Peso do tecido adiposo de ratas adultas – G1.....	58
6.1.3	Avaliação do Índice de <i>Lee</i> de ratas adultas – G1	59
6.2	AVALIAÇÃO MACHOS G2.....	60
6.2.1	Avaliação do peso – G2	60
6.2.2	Peso de gorduras - G2.....	61
6.2.3	Avaliação do Índice de <i>Lee</i> - G2	62
6.2.4	Comportamento de brincar – G2.....	63

6.2.5 Reconhecimento de objetos – G2.....	64
6.2.6 Avaliação da locomoção espontânea – G2.....	65
6.3 AVALIAÇÃO MOLECULAR POR PCR – G2.....	66
6.3.1 Rest – G2	66
6.3.2 Line-1 – G2.....	68
6.3.3 DNMT1 – G2	69
6.3.4 DNMT3a – G2	70
6.3.5 DNMT3b – G2	71
6.3.6 TET1 – G2.....	72
6.3.7 TET2 – G2.....	73
6.3.8 TET3 G2.....	74
6.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR POR WESTERN BLOT G2.....	75
6.4.1 GFAP- G2.....	75
6.4.2 BDNF - G2.....	76
6.4.3 PSD95 – G2.....	77
6.4.4 OTR – G2.....	78
6.5 RESUMO DOS RESULTADOS MOLECULARES – G2.....	79
7 DISCUSSÃO.....	81
8 CONCLUSÃO.....	94
REFERÊNCIAS.....	95
ANEXOS.....	106

1 INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença metabólica crônica caracterizada pelo excesso de gordura corporal resultante do desequilíbrio prolongado entre o consumo alimentar e o gasto energético e está associada com o desenvolvimento de comorbidades como diabetes mellitus tipo 2, inflamação crônica, hipertensão e dislipidemia. Sua etiologia é multifatorial e está relacionada a fatores genéticos, ambientais, comportamentais e socioculturais (BADILLO-SUÁREZ; RODRÍGUEZ-CRUZ; NIEVES-MORALES, 2017).

Em uma grande parte da história humana, o excesso de peso foi considerado indicação de saúde bem como riqueza e prosperidade. Os gregos antigos foram os primeiros, no entanto, perceber os perigos da obesidade e sua associação com doença, sendo Hipócrates (460aC - 370aC) o primeiro a relacionar a obesidade com infertilidade e morte precoce. Ele também foi o primeiro a associar a modificação da dieta com a melhoria da saúde (HASLAM, 2007; KOMAROFF, 2016).

Anterior ao século XVIII, a obesidade era descrita como excesso de peso ou corpulência, sendo registrada pela primeira vez no século XVIII e associada com várias doenças. No início do século XX, surgiu uma preocupação com o baixo peso corporal por causa da ameaça da pneumonia e tuberculose, sendo o peso saudável dado pela associação entre peso corporal e mortalidade e o excesso de peso definido como o peso que excedeu o valor de referência. Nas primeiras décadas do século XX, surgiram os primeiros relatos da associação da obesidade com aumento da mortalidade (EKNOYAN, 2006; HASLAM, 2007; KOMAROFF, 2016).

Atualmente o método mais utilizado mundialmente para classificar o peso é o índice de massa corporal (IMC) que é calculado utilizando o peso corporal em quilogramas dividido pela altura em metros quadrados (kg / m^2). De acordo com IMC os indivíduos são alocados em cinco categorias diferentes: baixo peso ($<18,5 \text{ kg} / \text{m}^2$), normal ($18,5 - 24,9 \text{ kg} / \text{m}^2$), sobrepeso ($25,0 - 29,9 \text{ kg} / \text{m}^2$), obeso classe 1 ($30,0 - 34,9 \text{ kg} / \text{m}^2$), obeso classe 2 ($35,0 - 39,9 \text{ kg} / \text{m}^2$) e obeso classe

3 ($\leq 40 \text{ kg} / \text{m}^2$) de acordo com o cálculo de IMC foi definida em 1983 sendo hoje em dia um método internacional padrão utilizado para classificação de peso (ENGIN, 2017; KOMAROFF, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (2022) aponta que mais de 1 milhão de pessoas no mundo são obesas, sendo mais de 650 milhões de adultos, 340 milhões adolescentes e 39 milhões de crianças obesas.

A obesidade entre crianças tem implicações ao longo da vida, como a prevalência de obesidade na vida adulta e suas causas estão relacionados ao estilo de vida sedentário, consumo de dieta altamente calórica, fatores genéticos, estado nutricional da mãe e alimentação infantil durante o primeiro ano de vida (OHLENDORF, *et al.*, 2019; PATEL; SRINIVASAN, 2010; SCHWARTZ, 2006).

As consequências da obesidade em modelos animais foram estudadas pela primeira vez em 1949 em ratos ao ofertar dieta altamente palatável. Desde então muitos estudos foram desenvolvidos a fim de entender os mecanismos para gerar a obesidade e também para sua prevenção, sendo estudados, principalmente em roedores nos quais são utilizados vários métodos de estudo da obesidade como: o camundongo *ob/ob* geneticamente obeso, a indução da obesidade por excesso de alimentos altamente palatáveis, dietas hiperlipídica e com grande quantidade de carboidrato, assim como a redução do tamanho de ninhada. Esses modelos animais induzem a doença de maneira mais semelhante à gênese de obesidade em humanos (ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018; FERNANDES *et al.*, 2016; HARIRI; THIBAUT, 2010; INGLE, 1949; RIBEIRO *et al.*, 2018; SPEAKMAN *et al.*, 2007).

Hoje em dia há um crescente interesse em entender como a obesidade materna é capaz de alterar o neurodesenvolvimento dos seus descendentes, como por exemplo no estudos de Bukhari, Clark e Williamson (2018) que demonstram que intervenções nutricionais gestacionais ou perinatais, podem gerar prejuízos no neurodesenvolvimento de seus descendentes, e para avaliar essa programação neonatal, eles utilizaram um modelo de plasticidade do desenvolvimento onde as mães foram alimentadas com uma dieta rica em frutose e foi observado um aumento no comportamento tipo ansioso nas proles quando comparadas com o controle que consumiu ração normal.

Em um estudo utilizando dieta rica em gordura com ratas *Wistar* adultas durante 8 semanas antes do acasalamento, durante a gestação e lactação foi observado um aumento do peso dos filhotes tanto macho quanto fêmea após o dia pós natal 12 (PND12), sendo observado ao desmame um aumento no peso das gorduras subcutâneas, viscerais e gordura marrom, de machos e fêmeas quando comparado aos filhotes de mães controle que receberam ração normal (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Utilizando a dieta de cafeteria em camundongos durante a gestação, foram observadas alterações no comportamento materno e atraso no desenvolvimento físico e neurológico, apresentando impacto sobre o comportamento emocional na prole adolescente (RIBEIRO *et al.*, 2018).

A redução no tamanho da ninhada também foi demonstrada eficiente como indutor de obesidade, modulando permanentemente a adiposidade e circuitos hipotalâmicos que controlam a ingestão de alimentos e equilíbrio energético na idade adulta (HABBOUT; ROCHETTE; VERGELY, 2013; PLAGEMANN *et al.*, 1998).

A redução do tamanho da ninhada em roedores foi primeiramente demonstrada por Kennedy (1957) e tem sido usado para induzir a supernutrição na vida pós-natal imediata da prole e utilizada também para investigar as consequências do ganho de peso excessivo pós-natal (DE NOVAIS *et al.*, 2021; FIOROTTO, 1991; MOZES; SEFCIKOVA; RACEK, 2014; PATEL; SRINIVASAN, 2010).

O excesso de peso no modelo de redução de ninhada é devido à ausência de competição e uma maior ingestão de leite causada por maior disponibilidade, e, além disso, aumento da concentração de gordura no leite, provocando consequências sobre a prole durante o desenvolvimento físico e neurocomportamental (FIOROTTO, 1991; HABBOUT; ROCHETTE; VERGELY, 2013; MOZES; SEFCIKOVA; RACEK, 2015; PLAGEMANN *et al.*, 1998).

Debarba (2017) utilizou a redução do tamanho da ninhada (3 filhotes, ninhada reduzida (NR), 10 filhotes, ninhada normal (NN) e de 16 filhotes, ninhada

grande (NG) e foi observado maior peso corporal ao desmame (PND21) e essa diferença foi mantida até a idade adulta (PND60).

Em outro estudo com redução do tamanho da ninhada utilizando ratos *Wistar* na proporção de 4 filhotes (NR) e 10-12 filhotes (NN) por lactante, foi observado ao desmame que a quantidade de gordura e de leptina havia dobrado nos animais criados em NR, e também que a hiperinsulinemia parece desempenhar um papel fundamental para o desenvolvimento de resistência à leptina e risco de obesidade ao longo da vida destes ratos. Sendo assim, os autores sugeriram que o estado nutricional no período pós-natal imediato pode ter um impacto no risco cardiometabólico na vida adulta (SCHMIDT *et al.*, 2001).

Enes Marques e Giusti-Paiva (2018), utilizando a redução de ninhada na proporção de três filhotes (2 machos e 1 fêmea) para a ninhada foi reduzida (NR) e 12 filhotes (máximo 6 machos por ninhada) para a ninhada normal (NN), a prole NR, apresentou um aumento de peso desde o 8º dia de lactação até a fase adulta no PND 56 e aumento no índice de *Lee* em fêmeas. O índice de *Lee* em roedores se compara ao IMC de humanos.

A obesidade materna em ratos, que foi induzida na infância e avaliada na vida adulta durante a gravidez, foi associada à diminuição da proliferação e maturação neuronal no córtex cerebral dos cérebros dos filhotes, possivelmente resultando em comprometimento do neurodesenvolvimento na idade adulta, podendo ser apontada como explicação para complicações posteriores do neurodesenvolvimento, incluindo paralisia cerebral, autismo, esquizofrenia e deficiências cognitivas (BURD *et al.*, 2010; ELOVITZ *et al.*, 2011; HAGBERG; GRESSENS; MALLARD, 2012; KUYPERS *et al.*, 2012; MALAEB; DAMMANN, 2009; STACHOWIAK *et al.*, 2013).

Porém, os mecanismos subjacentes para as associações entre a obesidade e o comprometimento no neurodesenvolvimento ainda não são bem entendidos e a prevenção da obesidade continua sendo de alta prioridade (MONTHÉ-DRÈZE *et al.*, 2018; OHLENDORF *et al.*, 2019).

Assim, a nutrição materna adequada é fundamental para o desenvolvimento físico, manutenção do crescimento e desenvolvimento de funções e sistemas

orgânicos da prole, sendo que uma alimentação inadequada no período pós-natal pode influenciar negativamente no neurodesenvolvimento e no comportamento da prole (BLACK *et al.*, 2013; MORGANE *et al.*, 1978).

Estudos recentes em humanos têm feito à associação entre obesidade materna e o transtorno do espectro autista (TEA) sendo observada uma associação significativa ao aumento do risco de se ter filhos com TEA (KRAKOWIAK *et al.*, 2012; LEI *et al.*, 2019).

Como observamos em nosso trabalho anterior que a obesidade materna induzida por redução de ninhada na proporção de 4 filhotes na ninhada reduzida (2 machos e 2 fêmeas) para 12 filhotes na ninhada normal (6 machos e 6 fêmeas) foi capaz de alterar o neurodesenvolvimento dos seus descendentes, pois observamos que os filhotes, principalmente os machos apresentavam comportamento semelhante ao TEA e também foi capaz de alterar a quantidade de sinaptofisina, no hipocampo dos machos de mães obesas quando comparados aos filhotes macho de mães do grupo NN (DE NOVAIS *et al.*, 2021).

O TEA impacta significativamente nos custos pessoais, sociais e econômicos assim como na qualidade de vida e independência funcional. Nas últimas décadas houve um aumento dos casos de crianças diagnosticadas com TEA e de acordo com a Organização Mundial da Saúde hoje em dia uma em cada 100 crianças são diagnosticadas com TEA e comumente acompanhadas de alguns transtornos psiquiátricos como a ansiedade e depressão (MAKUSHKIN; MAKAROV; PASHKOVSKIY, 2019; ROSEN *et al.*, 2018; STEFANIK *et al.*, 2018; WHO, 2022)

O TEA é uma desordem neurobiológica complexa, derivada da palavra grega *autos*, que significa um eu isolado, caracterizada pelo DSM-5 por déficits persistentes na comunicação social e interação social e na reciprocidade socioemocional, assim como comportamento com padrões Restritos e repetitivos. As desordens geralmente são diagnosticadas até os 5 anos de vida e sua ocorrência é cinco vezes maior em meninos em comparação as meninas (AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION, 2014; BHAT *et al.*, 2014; WHO, 2022).

Porém os mecanismos moleculares responsáveis pela prevalência do TEA ser maior em homens do que em mulheres ainda não são bem compreendidos. (PANAHI *et al.*, 2022).

Na neurobiologia, o Transtorno do Espectro Autista (TEA) é entendido como uma condição que resulta de uma reorganização geral do cérebro, que ocorre desde o início do desenvolvimento. Um dos achados mais consistentes é o padrão de supercrescimento do volume cerebral na infância e primeira infância, que pode ser observado por meio de diferenças no volume cerebral em imagens cerebrais (LORD *et al.*, 2018; URBONAITE *et al.*, 2022).

Crianças com TEA apresentam um desenvolvimento cerebral acelerado no início da vida em comparação com crianças com desenvolvimento típico, o que resulta em conectividade cerebral alterada. A conectividade é um conceito que engloba tanto as interconexões físicas quanto as correlações ou interações causais na atividade de diferentes regiões cerebrais. Em geral, os achados mostram um padrão de subconectividade geral no cérebro, juntamente com superconectividade local em regiões específicas, especialmente nas regiões frontal e occipital (LORD *et al.*, 2018).

Diversas estratégias são utilizadas para induzir comportamentos semelhantes ao autismo em roedores com o objetivo de compreender esse transtorno do neurodesenvolvimento, incluindo o uso de camundongos geneticamente modificados BTBR e exposição materna a lipopolissacarídeo, ácido propiônico, ácido valpróico ou ácido poliinosínico-politidílico. Além disso, sabe-se que as condições metabólicas maternas são consideradas fatores de risco para o TEA (BATISTA; GIUSTI-PAIVA; VILELA, 2019; CARLEZON-JR *et al.*, 2019; CUSTÓDIO *et al.*, 2017; DE NOVAIS *et al.*, 2021; DOBROVOLSKY *et al.*, 2019; KIRSTEN *et al.*, 2018; MEEKING *et al.*, 2020; PANJWANI *et al.*, 2019; TARTAGLIONE *et al.*, 2019).

Apesar da prevalência crescente, a fisiopatologia do TEA ainda não é bem entendida. Há evidências do envolvimento genético na etiologia deste transtorno, uma vez que nascidos em família com irmãos com TEA têm um risco 35-40% maior de desenvolver TEA. Além disso, alterações no desenvolvimento de

estruturas neuronais e axonais, envolvendo a sinaptogênese, estão fortemente envolvidas no desenvolvimento do TEA (EISSA *et al.*, 2018).

A prevalência da obesidade materna vem aumentando em paralelo ao aumento da prevalência do TEA. Estudos demonstram que a obesidade pré-gestacional materna afeta uma em cada três mulheres em idade fértil e tem sido associada à problemas na saúde e no neurodesenvolvimento da criança (FLEGAL *et al.*, 2016; LEI *et al.*, 2019).

O período neonatal é crítico para a plasticidade do desenvolvimento, podendo influenciar em alterações do desenvolvimento estruturais e funcionais duradouras, pois os mecanismos fisiológicos e metabólicos não estão completamente maduros neste período (DEARDEN; OZANNE, 2015).

Filhos de mães obesas, apresentam 40% mais chances de apresentarem comprometimento emocional / comportamental e 60% mais chances de ser diagnosticado com distúrbio do desenvolvimento neurológico, além de menor desempenho cognitivo, sendo associado a uma diminuição do quociente de meio ponto de inteligência (QI) nas crianças aos 5 anos de idade em comparação aos filhos de mães com peso normal (BLIDDAL *et al.*, 2014; SANCHEZ *et al.*, 2018; WIDEN, *et al.*, 2019).

Lyll e colaboradores (2011) foram os primeiros a associar a obesidade gestacional em humanos com o aumento do risco de ter filhos com TEA. Desde então surgiram muitos estudos populacionais relacionando a obesidade pré-gestacional e a obesidade gestacional com o desenvolvimento de descendentes com TEA (AHLBERG *et al.*, 2022; GAWLIŃSKA *et al.*, 2021; KONG *et al.*, 2018; KRAKOWIAK *et al.*, 2012; LEI *et al.*, 2019; PANJWANI *et al.*, 2019; VARCIN; NEWNHAM; WHITEHOUSE, 2019; WINDHAM *et al.*, 2019).

Sugerindo que a obesidade gestacional ou pré-gestacional aumenta as chances de ter filhos com TEA, sendo as crianças do sexo masculino mais afetadas (MATIAS *et al.*, 2021).

De fato, no estudo de Gawlińska e colaboradores (2021) foi demonstrado que a dieta hiperlipídica durante a gestação e lactação foi capaz de perturbar a expressão de genes relacionados ao TEA somente nos descendentes machos.

Em nosso estudo anterior, utilizamos a redução do tamanho da ninhada de ratas *Wistar* para induzir a obesidade observamos que a obesidade materna alterou o neurodesenvolvimento e comportamento em seus descendentes e principalmente os machos apresentaram comportamento semelhante ao TEA (DE NOVAIS *et al.*, 2021).

Mesmo com todos os esforços e avanços científicos alcançados nos últimos anos, a etiologia dos distúrbios do neurodesenvolvimento ainda permanece incerta e parece envolver uma sobreposição considerável entre os fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e uso de produtos farmacêuticos. Está bem estabelecido que, durante o período pré-natal e pós-natal precoce, o desenvolvimento cerebral é muito suscetível a fatores ambientais como a alimentação, podendo estas adversidades do início da vida promoverem efeitos a longo prazo na saúde física e mental. Resultados obtidos em modelos animais e dados apresentados em revisões baseadas em evidências de análises sistemáticas e metanálises mostram que até 40-50% da variação na responsabilidade pelo TEA pode ser determinada por fatores ambientais e alterações epigenéticas (MODABBERNIA *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, a epigenética emergiu como um componente integral do desenvolvimento cerebral, envelhecimento e vários distúrbios do SNC. As marcas epigenéticas, como metilação do DNA e modificações pós-traducionais de histonas medeiam a influência do meio ambiente no genoma, regulando as cascatas de programas transcricionais cruciais para a estabilidade e plasticidade dos circuitos neuronais (FAGIOLINI *et al.*, 2009; SINGH; SINGH, 2019).

Inúmeras evidências têm demonstrado que a desregulação da maquinaria epigenética está fortemente relacionada ao desenvolvimento de deficiências neuro-comportamentais e distúrbios psiquiátricos por interromper eventos-chave durante os estágios do desenvolvimento pré e pós-natal pela reprogramação gênica alterando o desenvolvimento normal do cérebro (BREDY *et al.*, 2010).

Dentre os mecanismos epigenéticos, a metilação do DNA é a modificação epigenética mais bem estudada e se caracteriza por ser uma modificação química na qual ocorre a transferência de um grupamento metil proveniente do SAM (S-adenosilmetionina) à posição C5 do anel da citosina. Esta transferência é

catalisada pela ação de uma família de enzimas que recebe o nome de DNA metiltransferases, DNMT1, DNMT3a e DNMT3b. Os membros desta família possuem capacidades diferenciais que se diferenciam entre a manutenção do padrão de metilação pré-existente durante a divisão celular e na criação de novos padrões de metilação. A DNMT1 por estar localizado nos focos de replicação e possuir a capacidade de reconhecimento dos dinucleotídeos CpG hemimetilados é a enzima responsável na manutenção do padrão de metilação, copiando os padrões de hemimetilados para fita recém-formada durante a replicação. Enquanto os membros da família DNMT3 (DNMT3a e DNMT3b) agem para estabelecer novos padrões de metilação (LEONHARDT *et al.*, 1992).

Este mecanismo regula funções celulares essenciais no desenvolvimento embrionário normal, como a estabilidade do genoma, a inativação do cromossomo X, o imprinting genômico, a reprogramação de genes não imprintados, além de atuarem na plasticidade do desenvolvimento, de modo que, a exposições a fatores endógenos ou exógenos nocivos durante períodos críticos do desenvolvimento podem alterar permanentemente a estrutura ou função de sistemas orgânicos pela ativação ou inativação gênica mediada pela ação destas enzimas. Adicionalmente, as enzimas da família dioxigenases dependentes de 2-oxoglurato (2OG) e ferro (II) (TETs) 1, 2 e 3 atuam no processo de demetilação ativa do DNA, oxidando o grupamento metil da citosina metilada (TANG; HO, 2007).

A pesquisa sobre o papel de fatores etiológicos não genéticos, como epigenética (especialmente metilação anormal do DNA) e interações ambientais, tem sido intensificada devido ao aumento contínuo na incidência de TEA nas últimas duas décadas (GAWLIŃSKA *et al.*, 2021).

Assim um foco importante deste estudo foi avaliar se a obesidade materna altera a metilação global no hipocampo e córtex pré-frontal da prole por meio da análise do Elemento Nuclear Intercalado Longo-1 (Line-1) (ZHAO *et al.*, 2017).

Essas estruturas encefálicas foram escolhidas por terem uma grande importância na fisiopatologia do TEA, especialmente, o córtex pré-frontal (PFC), que regula vários traços autistas centrais pois sabe-se que é uma estrutura encefálica que desempenha papéis-chave nas funções sociais, emocionais e

cognitivas em humanos e roedores (GANDHI *et al.*, 2023; SAKAMOTO; YASHIMA *et al.*, 2022)

As áreas do córtex pré-frontal (PFC) implicadas no autismo incluem BA9, que desempenha funções como trabalho e memória espacial, fluência verbal, atenção auditiva e verbal, bem como atribuição de intenção; BA46, também conhecida como PFC dorsolateral, que tem papel na atenção e memória de trabalho; e BA47, responsável pelo processamento de sintaxe em línguas orais e de sinais. No autismo, as funções cognitivas dessas áreas (BA46, BA47 e BA9) são afetadas (HASHEMI *et al.*, 2017).

O hipocampo é uma estrutura encefálica importante para a cognição e memória, sendo uma estrutura muito sensível à alterações epigenéticas por ser uma área onde a neurogênese continua ocorrendo durante a vida toda (GILLOTIN *et al.*, 2021; VAN DEN BERGH *et al.*, 2018).

LINE-1 é um elemento móvel de DNA que compõe cerca de 17% do genoma humano. São sequências repetitivas que se movem para diferentes locais no genoma e podem causar mutações genéticas e instabilidade cromossômica. Eles são chamados de "elementos retrotransponíveis" ou "retrotransposons", que são segmentos de DNA capazes de se mover dentro e entre os cromossomos utilizando um mecanismo de "copiar e colar" para se propagar por todo o genoma por meio de intermediários de RNA (XIAO-JIE *et al.*, 2016)

A metilação do LINE-1 é um marcador epigenético para avaliar a metilação global do DNA que tem sido estudado em várias doenças, incluindo o câncer e o autismo. A hipometilação do LINE-1 tem sido associada a uma maior instabilidade genômica e ao desenvolvimento de certos tipos de câncer. No autismo, estudos sugerem que a hipometilação do LINE-1 pode estar associada a uma maior suscetibilidade genética e a alterações no desenvolvimento do cérebro (MCKEE *et al.*, 2018; XIAO-JIE *et al.*, 2016).

Sendo a redução da metilação global observada em estruturas encefálicas de descendentes de cujo a mãe foi alimentada com dieta rica em gordura durante a gestação e lactação (URBONAITE *et al.*, 2022).

Em adição, o projeto avaliou os efeitos da obesidade materna nos mecanismos epigenéticos envolvidos no controle transcricional do fator de transcrição silenciador RE1 (Rest). Isto porque O Rest é conhecido por ter um papel central na regulação da neurogênese, diferenciação neural e preservação do fenótipo neural, sendo sua regulação negativa necessária durante a diferenciação neural para o correto desenvolvimento de do Sistema Nervoso Central durante a embriogênese. Sua perda de expressão e translocação citoplasmática parece desempenhar um papel central no desenvolvimento de várias demências neurológicas (MAKSOUR; OOI; DOTTORI, 2020; ZHAO *et al.*, 2017).

O REST forma um complexo com as proteínas correpressoras REST (CoREST) para atuar como regulador transcricional bem caracterizado da neurogênese. Recentemente, a família de proteínas CoREST foi reconhecida como alvo de genes individuais, possuindo padrões de expressão distintos e funções independentes do fator de transcrição silenciador do elemento repressor 1 (RE1) (REST) na regulação transcricional da neurogênese (MAKSOUR; OOI; DOTTORI, 2020).

Considerado um regulador transcricional crítico para o sistema nervoso, Rest atua ligando-se a um grupo central de cerca de 1200 regiões genômicas sintênicas tanto em humanos quanto em camundongos. Esses locais são altamente conservados e enriquecidos com cofatores, modificações seletivas de histonas e hipometilação do DNA (ROCKOWITZ; ZHENG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016).

Em indivíduos idosos com comprometimento cognitivo leve ou na doença de Alzheimer, Rest está quase ausente nos núcleos dos neurônios corticais e do hipocampo, indicando que os níveis de Rest durante o envelhecimento estão intimamente correlacionados com cognição e longevidade. Achados mostraram que a expressão de Rest é importante para função cerebral normal, reprimindo genes que promovem a morte celular e induzindo a expressão de genes de resposta ao estresse protegendo o cérebro contra o estresse oxidativo (LU *et al.*, 2014).

Por ter um papel tão importante no neurodesenvolvimento e na manutenção neural o Rest vem sendo estudado por ter associação a expressão de vários genes relacionados com o TEA (CHENG *et al.*, 2022; KAWASE, *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2016).

Além disso, como já é bem estabelecido a relação da função cognitiva com a neurogênese hipocampal, nós também avaliamos a expressão proteica por *Western blot* de proteínas envolvida com a plasticidade e função sináptica (VAN DEN BERGH *et al.*, 2018).

Avaliamos a expressão proteica do Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro (BDNF), uma proteína importante durante o desenvolvimento por promover a sobrevivência e a diferenciação de populações neuronais selecionadas do sistema nervoso periférico e central (BACH *et al.*, 2023).

Avaliamos também a expressão proteica da Proteína de Densidade Pós-Sináptica 95 (PSD95), essa proteína é importante para a sinapse glutamatérgica pois interage em locais pós-sinápticos para formar um andaime multimérico para o agrupamento de receptores, canais iônicos e proteínas de sinalização associadas (COLEY; GAO, 2018).

A avaliação da expressão proteica do receptor de ocitocina (OTR), também foi realizada, pois sabe-se que alterações na disponibilidade de ocitocina vem sendo relacionado com alterações comportamentais encontradas em roedores utilizados para estudo do comportamento semelhante ao autismo (REICHOVA *et al.*, 2020).

E por fim, avaliamos a expressão proteica da Proteína Ácida Fibrilar Glial (GFAP), uma proteína presente em astrócitos reativos e normalmente utilizados como marcador de neuroinflamação, sendo sua quantidade elevada muito encontrada em pacientes com TEA e em roedores utilizados como modelos de obesidade (MATTA; HILL-YARDIN; CRACKA, 2019; MILLER; SPENCER, 2014).

Assim, nosso estudo busca entender através de algumas marcas epigenéticas, sinápticas e de neuroinflamação os possíveis mecanismos pelos

quais a obesidade materna induz comportamento semelhante ao autismo em seus descendentes machos.

2 JUSTIFICATIVA

A Organização Mundial da Saúde (2022) aponta que a obesidade mundial quase triplicou desde 1975, sendo nos Estados Unidos da América (USA) o país com a maior prevalência de obesos, aproximadamente 40% da população. Baseado no fato de que a obesidade materna observada em humanos está associada positivamente com descendentes diagnosticados com transtornos do espectro autista (TEA), que a prevalência de TEA em estados dos USA é aproximadamente 2,3 vezes superior comparada à prevalência mundial e que é quatro vezes maior em meninos do que em meninas e que não há na literatura como acontece essa interação, nós investigamos os mecanismos epigenéticos, sinápticos e astrogliol associados com transtornos do neurodesenvolvimento decorrentes machos de mães obesas (CDC, 2020; WHO, 2022).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos comportamentais induzidos pela obesidade materna por redução de ninhada e investigar marcadores epigenéticos, sinápticos e relativo à neuroinflamação em ratos machos em idade pré-púbere.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Caracterização da obesidade – (G1):

- a) Verificar se a redução de ninhada altera o ganho de peso desde o período neonatal até a vida adulta;
- b) Verificar se a redução da ninhada altera o peso das gorduras viscerais em ratas adultas;
- c) Verificar se a redução da ninhada altera o índice de *Lee* em ratas adultas.

3.2.2 Caracterização da obesidade – (G2):

- a) Verificar se a obesidade materna altera o ganho de peso desde o período neonatal até a idade pré-púbere em seus descendentes machos;
- b) Verificar se a obesidade materna altera o peso das gorduras viscerais descendentes machos;
- c) Verificar se a redução da ninhada altera o índice de *Lee* em descendentes machos.

3.2.3 Avaliação comportamental de ratos machos em idade pré-púbere (PND28-32) – (G2):

- a) Avaliar o interesse em brincar socialmente;
- b) Avaliar o reconhecimento de objetos;
- c) Avaliar a atividade locomotora espontânea.

3.2.4 Avaliação marcadores epigenéticos no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos machos em idade pré-púbere (PND28-32) – (G2):

- a) Avaliar a expressão gênica e metilação do Rest;
- b) Avaliar a expressão gênica e metilação do Line-1;
- c) Avaliar a expressão gênica de enzimas que metilam o DNA: DNMT1, DNMT3a, DNMT3b; -
- d) Avaliar a expressão gênica de enzimas que demetilam o DNA: TET1, TET2, TET3.

3.2.5 Avaliação marcadores de astrócito reativo, neurogênicos e sinápticos no córtex pré-frontal e no hipocampo de ratos machos em idade pré-púbere (PND28-32) – (G2):

- a) Avaliar a expressão proteica de GFAP;
- b) Avaliar a expressão proteica de BDNF;
- c) Avaliar a expressão proteica de PSD95;
- d) Avaliar a expressão proteica do receptor de ocitocina (OTR).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Antes de qualquer procedimento, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) nº 26/2021.

Os animais foram obtidos do Biotério Central da UNIFAL-MG. Sendo utilizadas ratas *Wistar* fêmeas de 6 a 8 semanas de vida, com peso entre 200 gramas e 250 gramas e machos da mesma linhagem com idade entre 8 a 10 semanas e pesando de 250 gramas e 300 gramas para acasalamento. Após a chegada do biotério dos animais da geração 0 (G0), eles ficaram por um período de ambientação por 7 dias, onde foram agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa e mantidos em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção, em condições controladas de temperatura (22 ± 2 °C) e iluminação com livre acesso à água e ração. Os animais durante todos os procedimentos experimentais ficaram mantidos em ambiente com temperatura controlada de 23 ± 1 °C, sob regime de luz com ciclo claro–escuro de 12/12 horas (período de luz: 07h às 19h) e receberam dieta padrão e água *ad libitum* durante todo período experimental.

4.2 ACASALAMENTO

Após o término do período de ambientação as ratas foram transferidas para caixas com ratos sexualmente experientes, na proporção de duas fêmeas para cada macho. Na manhã do dia seguinte foi feito um lavado vaginal, se encontrado espermatozoides, foi considerado o dia de gestação 0 (GD0) e as ratas prenhas foram separadas a cada 3 por caixa até o 15º dia de gestação, onde foram

separadas individualmente. O dia do nascimento dos filhotes foi designado como o dia pós-natal 0 (PND0).

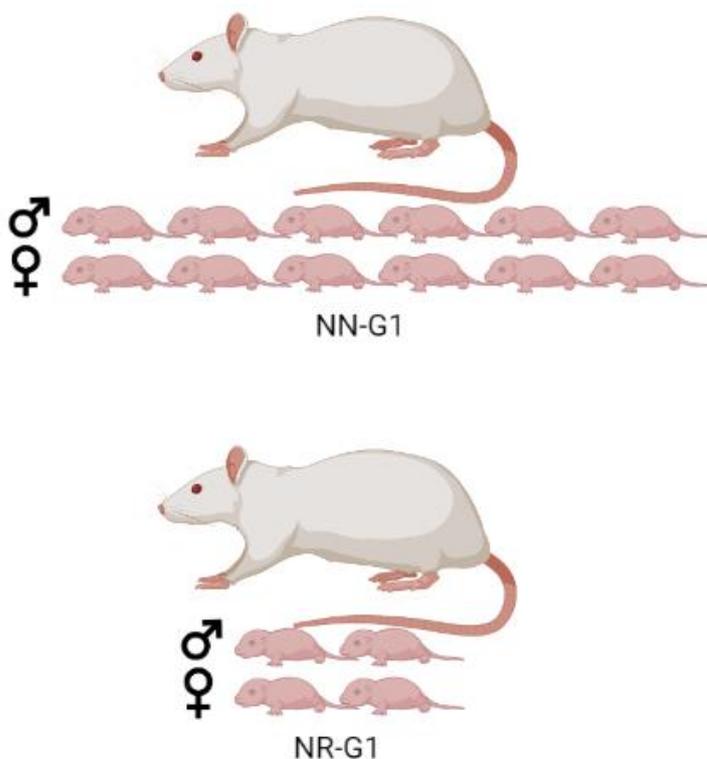
4.3 INDUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE PRECOCE POR REDUÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA – G1

4.3.1 Redução do tamanho da ninhada

Animais provenientes do biotério central da UNIFAL foram considerados geração 0 (G0) e seus filhotes, que foram submetidos a redução do tamanho da ninhada, geração 1 (G1).

A padronização da ninhada G1 foi realizada no PND1 em dois grupos experimentais, onde o grupo da ninhada normal foi padronizado em 12 animais por ninhada, sendo 6 machos e 6 fêmeas e o grupo ninhada reduzida em 4 animais com 2 machos e 2 fêmeas por ninhada.

Figura 1 - Representação do modelo de indução de obesidade precoce por redução do tamanho da ninhada.



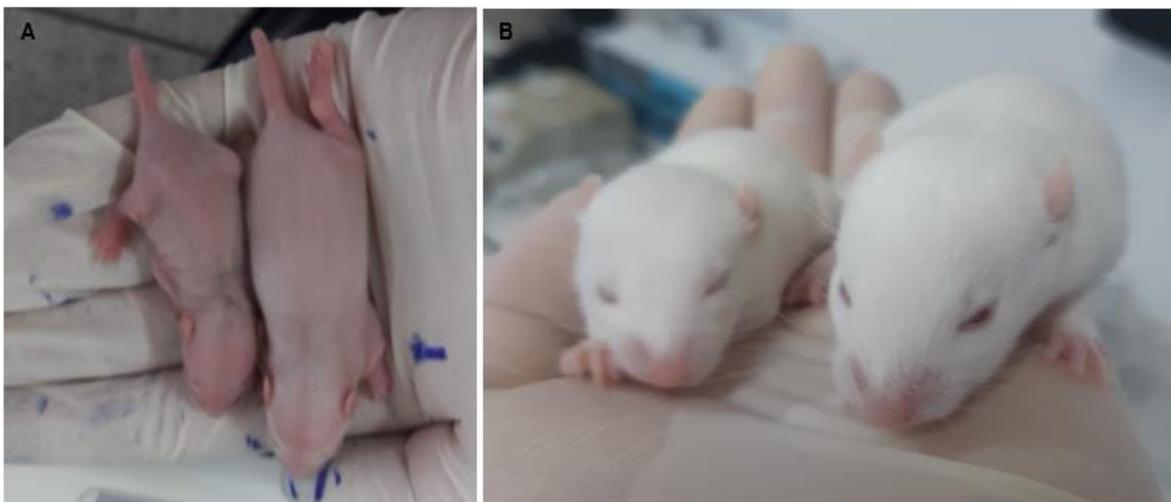
Fonte: Da autora, criado com Biorender.

Legenda: Imagem representando a padronização dos filhotes (G1) que foram criados em ninhada normal ou em ninhada reduzida.

4.3.2 Acompanhamento do ganho de peso - G1

Ninhadas dos grupos NN-G1 e NR-G1 foram pesados semanalmente desde 1º dia pós nascimento (PND1) até o desmame no PND21 e após esse período o experimento foi continuado apenas com as fêmeas, onde a pesagem foi feita de forma individual até a vida adulta.

Figura 2 - Representação da diferença física apresentada nos primeiros anos de vida de fêmeas criadas em ninhada reduzida em comparação com as fêmeas criadas em ninhada normal.



Fonte: Da autora

Legenda: Imagem de fêmeas G1 provenientes de ninhada normal (esquerda de cada figura) e ninhada reduzida (direita de cada figura), na primeira (A - PND8) e na segunda semana de vida (B - PND15) demonstrando que o modelo de redução do tamanho da ninhada promove alterações físicas já nos primeiros dias de vida.

4.3.3 Índice de Lee e peso do tecido adiposo – G1

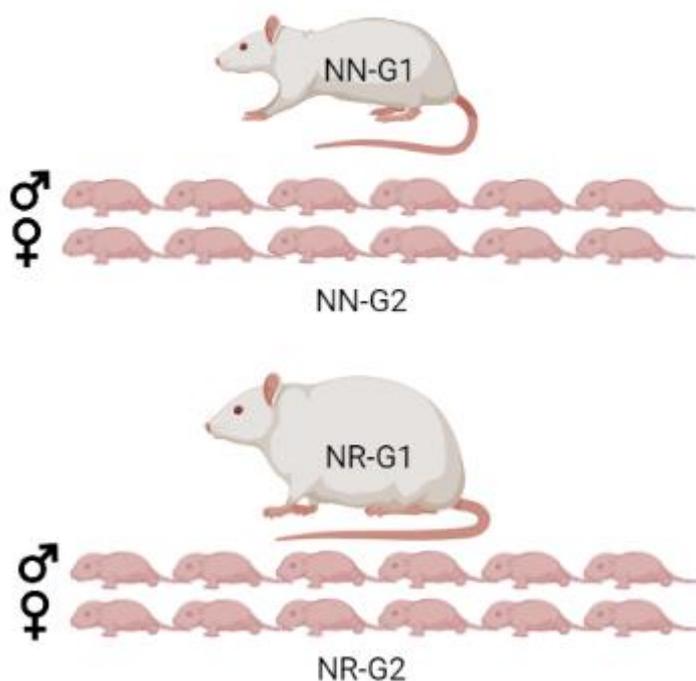
Fêmeas adultas dos grupos NN-G1 e NR-G1 na idade de acasalamento (PND56) foram eutanasiadas com excesso de anestésico inalatório isoflurano, foi avaliado o Índice de Lee [peso corporal (g) $1 = 3 /$ comprimento nasoanal (cm) 100] (SANCHES *et al*, 2016) e as gorduras retroperitoneal e perigonadal extraídas e pesadas.

4.4 PADRONIZAÇÕES DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS DA SEGUNDA GERAÇÃO – G2

Fêmeas adultas dos grupos NN-G1 e NR-G1 foram colocadas para acasalar com machos experientes provindos do biotério central e seus filhotes NN-G2 e

NR-G2 foram padronizados no PND1 com 12 filhotes por mãe, sendo a proporção de 6 machos e 6 fêmeas por ninhada.

Figura 3 - Representação da padronização G2, filhos de mães obesas e controle.



Fonte: Da autora, criado com Biorender.

Legenda: Imagem representando a padronização dos filhotes (G2) de mães que foram criadas em ninhada normal (mãe NN) ou em ninhada reduzida (mãe NR)

4.5 AVALIAÇÃO DOS FILHOTES MACHOS - G2

4.5.1 Peso corporal, índice de *Lee* e peso do tecido adiposo

Do mesmo modo que foi descrito anteriormente com os grupos G1, seus descendentes seguiram a mesma avaliação para caracterização da obesidade. Filhotes machos na idade pré-púbere (PND28-32) dos grupos NN-G2 e NR-G2

foram pesados semanalmente até o PND28, eutanasiados com excesso de anestésico inalatório isoflurano, foram avaliados seu Índice de Lee [peso corporal (g) 1 = 3 / comprimento nasoanal (cm) 100] e o peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal extraídas e pesadas (SANCHES *et al.*, 2016).

4.5.2 Comportamento de brincar

O teste do comportamento de brincar na idade pré-púbere e de interação social na idade adulta foi realizado em uma caixa quadrada de acrílico (60 cm x 60 cm x 60 cm). Os ratos foram individualmente habituados à caixa de teste durante 10 minutos por 2 dias antes do experimento. No dia do teste (PND 28-32), os animais foram isolados por 3h30min antes do teste para aumentar sua motivação social e assim facilitar a expressão do comportamento juvenil de brincadeira e adulto de interagir socialmente (DE NOVAIS *et al.*, 2021; TREZZA; BAARENDSE; VANDERSCHUREN, 2009; TREZZA; VANDERSCHUREN; 2008).

O teste consistiu em colocar dois animais pertencentes ao mesmo grupo experimental na arena de teste durante 10 minutos e o tempo de interações totais foram registradas para posterior análise. Sendo considerado interação, todas as vezes que os animais seguiam, cheiravam ou tocavam o outro animal. Com o objetivo de reduzir as interferências nas respostas comportamentais, os animais em pares não diferiram mais de 10 g no peso corporal e não apresentaram experiência social anterior (DE NOVAIS *et al.*, 2021).

Figura 4 - Comportamento social de brincar / interação social



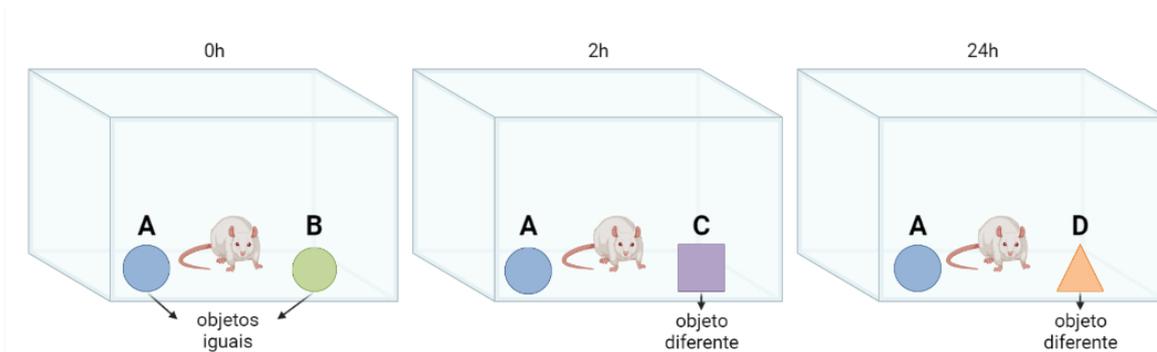
Fonte: Da autora, criado com Biorender.

4.5.3 Reconhecimento de objetos

O teste de reconhecimento de objetos avalia a habilidade do roedor em reconhecer um objeto previamente explorado na presença de um novo objeto não conhecido (REGGER; HOVDA; GIZA, 2009).

Dois dias antes do teste, os animais foram expostos a caixa teste (10 minutos) para a habituação para garantir que os animais passem quantidade suficiente de tempo explorando os objetos e não o ambiente. O teste foi realizado no PND28-32 em uma arena quadrada (40 cm x 40 cm) com o chão coberto com maravalha. No dia do teste os animais foram apresentados a 2 objetos idênticos (A e B) durante 10 minutos (treinamento), 2 horas após, o objeto de treinamento B (objeto familiar) foi substituído por um novo objeto C (objeto novo) e 24 horas após, o objeto C foi substituído por um novo objeto D (objeto novo) conforme podemos observar na figura 6. Todos os objetos apresentaram texturas e tamanhos semelhantes, mas formas distintas. Os ratos machos e foram colocados individualmente na arena e seu comportamento foi filmado por 10 minutos para análise subsequente. A exploração foi definida da seguinte forma: quando o animal cheirou ou tocou o objeto com o focinho. O tempo gasto pelo animal explorando os dois objetos (objeto familiar ou novo) foi tomado como uma medida de exploração de objetos. Um índice de reconhecimento (RI) foi calculado para cada animal e foi expresso pela razão: $IR = TN / (TF + TN)$, TF = tempo gasto explorando o objeto familiar (objeto A ou B); TN = tempo gasto explorando o novo objeto em 2h (C) e 24h (D). Entre os testes, os objetos e a arena foram devidamente limpos (MELANCIA, *et al.*, 2018).

Figura 5 - Reconhecimento de objetos

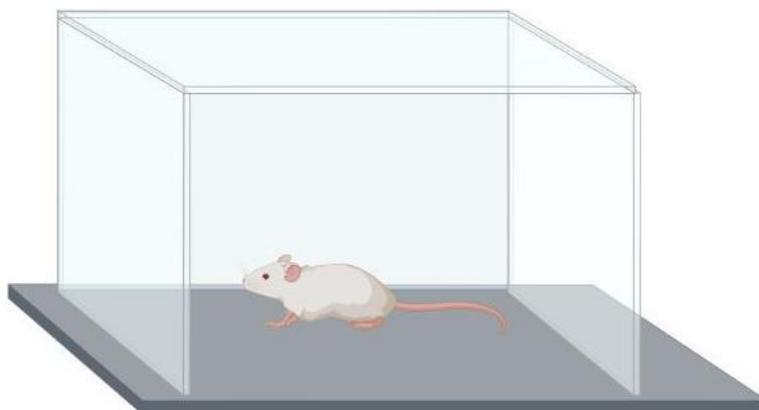


Fonte: Da autora, criado com Biorender.

4.5.4 Avaliação da locomoção no campo aberto

O teste do campo aberto consiste em uma arena quadrada de acrílico, (60cm x 60cm x 60cm), com o piso dividido em quadrantes centrais e periféricos. Cada filhote foi colocado no centro da arena e a sua atividade exploratória foi filmada por 20 minutos. O software Ethovision XT versão 9.0 foi utilizado para análise automática para avaliar a distância percorrida. Após o teste com cada animal, o aparato foi limpo com álcool 5% (DE NOVAIS *et al.*, 2021).

Figura 6 - Avaliação da locomoção espontânea no Campo Aberto



Fonte: Da autora, criado com Biorender.

4.6 AVALIAÇÃO DE MARCADORES EPIGENÉTICOS DOS MACHOS G2

4.6.1 Análise da expressão gênica

Extração de Ácido Ribonucleico (RNA) total

O RNA total foi isolado de estruturas cerebrais previamente coletadas pelo grupo utilizando o método TRIzol®/Clorofórmio/Isopropanol. Após homogeneização das estruturas em 0,5 mL do reagente TRIzol® a separação da fase aquosa foi realizada pela adição de 0,2 mL de clorofórmio e (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) e centrifugação (14.000 rpm) por 15 minutos a 4°C. Ao término da centrifugação a fase aquosa foi coletada (sobrenadante) em tubos devidamente identificado, sendo desprezada a fase precipitada. Em seguida, a precipitação do RNA foi realizada com adição de 0,5 mL de isopropanol absoluto gelado (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA). As amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos e novamente centrifugadas (14.000 rpm por 15 minutos). Ao término da centrifugação o isopropanol foi descartado por inversão e o RNA precipitado (*pellet*) foi lavado com etanol 75%, ressuspendido em 20 µL de água DEPC e armazenados a -80°C. A quantidade e pureza do RNA extraído foi estimada em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

Síntese de DNA complementar (cDNA)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir da transcrição reversa de 2000 ng de RNA total previamente extraído e armazenado em Biofreezer (-80) na presença de 2 U da enzima transcriptase reversa (Kit Superscript II, Invitrogen) (Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções recomendadas pelo fabricante. A primeira fita de cDNA foi gerada em reação com volume final de 20 µL contendo 500 µM de dNTP, µg/mL de OLIGO dT, 1X solução tampão de primeira fita, 40 U

de inibidor de RNase, 10 μ M de DTT pela enzima Superscript II. Inicialmente, a mistura de RNA, água e iniciador foi incubada a 65°C por 5 minutos para promover a abertura de possíveis estruturas secundárias e em seguida a reação de síntese aconteceu durante 50 minutos a 50°C, como inativação enzimática a 85°C por 5 minutos. Após o término da reação o cDNA sintetizado foi diluído a concentração final de 100 ng/ μ l e armazenado a -20°C.

Quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (q-PCR)

Para o estudo do padrão de expressão gênica as reações foram realizadas com iniciadores específicos. Todas as reações tiveram volume final de 10 μ L; contendo 5 μ L de SYBR Green I Master, 0,4 μ M de iniciadores específicos (Rest, Line-1, DNMT1, DNMT3a, DNMT3b, TET1, TET2, TET3), 1 μ L do cDNA sintetizado e q.s.p. de água *Milli-Q Rnase free*. A quantidade relativa dos transcritos foi determinada pelo método limiar crítico comparativo $2^{-\Delta C_t}$. Neste método, a média do C_t do gene alvo é subtraída pela média do C_t dos controles utilizados, resultando em um ΔC_t . Para o cálculo da quantificação substituímos o valor de ΔC_t obtido na fórmula $2^{-\Delta C_t}$. Os valores finais foram apresentados como razão entre a expressão do gene alvo em relação à média da expressão gênica dos genes utilizados como normalizadores. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de 5 animais realizados em triplicata normalizados em relação ao controle (atribuído valor 1).

4.6.2 Determinação do estado de metilação do DNA

Obtenção do DNA

Para obtenção das amostras de DNA genômico (gDNA) as estruturas previamente coletadas e armazenadas em Biofreezer (-80) foram

homogeneizadas em tampão de extração (10 mM de Tris pH 3.0; 0,5% de SDS, 5 mM de EDTA) e digeridas com proteínase K (20 mg/mL) por 16 h a 56°C. Em seguida o DNA foi isolado pelo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (Trevilato e Line, 2000). A quantidade e pureza do gDNA extraído foram estimadas em aparelho de espectrofotometria, utilizando as razões OD 260/280 ($\geq 1,8$) e OD 260/230 ($\geq 1,0$) (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, Uniscience).

Tratamento do DNA

Cada amostra de gDNA foi dividida em três tubos contendo a mesma concentração (400 ng) e incubados a 37°C por 2h com 1X NE buffer, 40 mM de glicose UDP e 1 unidade da enzima T4- β -glicosiltransferase (T4-BGT) em reação com volume final de 20 μ l. Esta enzima transfere especificamente a porção de glicose da difosfoglicose de uridina (UDP-Glc) para 5-hidroximetilcitosina (5-hmeC) pela reação de glicosilação, produzindo o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina, o qual bloqueia especificamente a atividade de endonuclease *MspI* e faz com que ela reconheça apenas as sequências de CCGG metiladas (5-meC) e não metiladas, mantendo integras as regiões CCGG hidroximetilcitosina (5-hmeC). Após a inativação da enzima T4-BGT por incubação a 65°C por 15 min, as amostras foram digeridas com as endonucleases *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA), que reconhece todas as sequencias CCGG (metiladas e não metiladas), com exceção apenas das sequências CCGG com o produto beta-glucosil-5-hidroximetilcitosina e pela *HpaII* (New England Biolabs, Beverly, MA, EUA) que reconhece todas as sequências CCGG com a diferença de que sequências CCGG metiladas (5-meC) promove a inibição de sua atividade catalítica. No terceiro tubo foi adicionado a mesma quantidade de H₂O (gDNA não digerido – controle 100%). Todas as reações foram realizadas separadamente com volume final de 25 μ l a 37°C por 2 horas.

Determinação do padrão de metilação

O padrão de metilação (5-meC) e hidroximetilação (5-hmeC) da região promotora dos genes do Retroelemento Line-1 (Line-1) e do Fator de transcrição de Silenciamento RE-1 (Rest) foi determinado em reações de qPCR contendo SYBR Green I Master 2x (12,5 µl) 0,4 µM de iniciadores específicos, 1,5 µl (25 ng) de gDNA tratado (nas 3 condições; H₂O, *MspI* e *HpaII*) e q.s.p de H₂O livre de nuclease. As sequências dos iniciadores foram desenhados em regiões regulatórias com ilhas CpG dentro de regiões de hipersensibilidade a DnaseI, reguladas por marcas de modificações de histonas e com sítios de ligação de fatores de transcrição utilizando o programa Primer3 Input (versão 0.4.0) ¹. A determinação de estruturas secundárias e temperaturas de anelamento foram analisadas pelo programa Beacon Designer (<http://www.premierbiosoft.com/>). Todas as sequências foram blastadas para confirmação da localização cromossômica pela ferramenta de PCR *in-silico* (<https://genome.ucsc.edu/>).

4.7 AVALIAÇÃO DE MARCADORES NEUROINFLAMATÓRIOS, NEUROPLÁSTICOS E SINÁPTICOS POR WESTERN BLOT

Após o término dos experimentos, o hipocampo e o córtex pré-frontal foram dissecados e armazenados em -80°C até o momento da realização do teste de Bradford. Para a realização do teste de Bradford as amostras foram homogeneizadas em tampão de lise com um coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Em seguida as amostras foram centrifugadas (9200 rpm, 15 minutos, 4°C) e a concentração de proteínas no sobrenadante foi quantificada pelo teste de Bradford. As amostras contendo o tampão de lise juntamente com *Laemmli* foram fervidas e submetidas a análise de *Western blotting*. As proteínas foram separadas por SDS-PAGE a 10% ou 12% dependendo o peso das proteínas (electroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio) e em seguida foram transferidas para membranas de nitrocelulose com um sistema electroforético semi-seco (Bio-Rad, Hercules, CA). A membrana foi lavada 3 vezes em PBS contendo 0,05% de *Tween* 20, bloqueada com 5% de leite desnatado e albumina em PBS durante 3 horas a temperatura ambiente e depois incubada *overnight*, a 4 °C com determinado

anticorpo primário. No dia seguinte, após 3 lavagens em PBS contendo 0,05% de *Tween 20*, as membranas foram incubadas durante 1 hora a temperatura ambiente com anticorpo secundário específico. Após o período de incubação, a membrana foi lavada 3 vezes em PBS 0,1 M contendo *Tween 20* a 0,05% e depois foi utilizado um kit de detecção comercial durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de detecção ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA). Posteriormente as membranas passarão pelo processo de *stripping* seguido do bloqueio em 5% de leite desnatado em PBS durante 2 horas. Após o bloqueio as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo *Tween 20* a 0,05%, seguida da incubação *overnight*, a 4 ° C com anticorpo anti-actina (1:5000, Sigma Aldrich 4700). No dia seguinte, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo *Tween 20* a 0,05%, e as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário (Anti-camundongo - *ab6789*) ou (Anti-coelho - *ab6721*). Após incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS 0,1 M contendo *Tween 20* a 0,05%, em seguida foi utilizado o mesmo kit de detecção durante aproximadamente 1 a 2 minutos (kit de deteco ECL, Bio-Rad, Hercules, CA). As imagens de análise foram capturadas por analisador de imagem por quimioluminescência (Chemidoc, Bio-Rad, Hercules, CA) e as intensidades das bandas foram quantificadas utilizando um software específico da Bio-Rad. A intensidade de cada banda foi normalizada em relação à da β -actina e os dados foram expressos normalizados para o controle (RIBEIRO *et al.*, 2020).

Tabela 1 - Especificação dos anticorpos utilizados para expressão proteica por Western Blot

Anticorpo	Código	[] 1º	Peso molecular	Origem	[] 2º
Anti-GFAP	sc33673	1:1000	50 kDa	camundongo	1:2000
Anti-BDNF	sc65514	1:1000	32 kDa	camundongo	-
Anti-PSD95	sc32290	1:1000	95 kDa	camundongo	1:2000
Anti-OTR	ab181077	1:2000	43-45 kDa	coelho	1:4000
Anti-Actina	A4700	1:4000	42 kDa	camundongo	1:2000

Fonte: Da autora

Legenda: [] - concentração

4.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Após ambientação no laboratório de Neuroimonomodulação, os animais foram colocados para acasalar na proporção de 2 fêmeas para cada 1 macho. Na manhã do dia seguinte, foi realizado um lavado vaginal, na presença de espermatozóide em fase estral, foi considerado o dia de gestação 0 (GD0).

O dia de nascimentos dos filhotes da geração 1 (G1) foi considerado como dia pós-natal zero (PND0), sendo a padronização das ninhadas realizada no PND1. Para tal, utilizamos dezesseis ratas prenhes, das quais, oito tiveram suas ninhadas padronizadas em ninhada reduzida (NR), composta por 4 filhotes, sendo 2 machos e 2 fêmeas e as outras oito, tiveram suas ninhadas padronizadas em ninhada normal (NN), sendo compostas por 12 filhotes, sendo 6 machos e 6 fêmeas por ninhada (DE NOVAIS *et al.*, 2021; SCHMIDT *et al.*, 2001).

Após o desmame das ninhadas NN-G1 e NR-G1, no PND21 somente as fêmeas provenientes de NR e NN, foram mantidas no biotério até atingirem a idade adulta. Os machos foram eutanasiados por excesso de anestésico inalatório Isoflurano.

O peso das ratas dos grupos NN-G1 e NR-G1 foi verificado semanalmente até a vida adulta no PND56 para juntamente com o índice de *Lee* e o peso das gorduras perigonadal e retroperitoneal fossem utilizadas para caracterização da obesidade ou colocadas para acasalar com machos experientes (provenientes do biotério central) conforme descrito anteriormente e seus filhotes foram considerados G2.

Após o desmame no PND21 somente os machos NN-G2 e NR-G2 foram mantidos no experimento e as fêmeas foram eutanasiadas por excesso de anestésico inalatório Isoflurano.

Os animais foram pesados semanalmente até o PND28 e após os testes comportamentais para avaliar os comportamentos semelhantes ao autismo com testes comportamentais para avaliar o interesse em brincar socialmente e o teste

de reconhecimento de objetos, os animais foram eutanasiados com excesso de anestésico inalatório Isoflurano para avaliar o índice de Lee, logo após, as estruturas encefálicas e gorduras foram dissecadas.

É importante salientar que para a obtenção dos filhotes machos provenientes de mães NN ou NR, foi utilizada somente uma fêmea de cada ninhada reduzida ou normal, para exclusão do efeito ninhada e cada animal passou por apenas um teste. (DE NOVAIS et al., 2021; LAZIC; ESSIUX, 2013; PLAGEMANN et al., 1998; VERONESI et al., 2017).

Assim, os grupos experimentais foram os seguintes:

Acompanhamento de peso desde o nascimento até e vida adulta de ratas dos grupos NR-G1 e NN-G1:

- a) Fêmeas criadas em ninhada reduzida (n=8);
- b) Fêmeas criadas em ninhada normal (n=8).

Avaliamos o peso do tecido adiposo: retroperitoneal e perigonadal das ratas vida adulta dos grupos NR-G1 e NN-G1:

- a) Fêmeas adultas criadas em ninhada reduzida (n=8);
- b) Fêmeas adultas criadas em ninhada normal (n=8).

Análise do índice de Lee das ratas vida adulta dos grupos NR-G1 e NN-G1:

- a) Fêmeas adultas criadas em ninhada reduzida (n=8);
- b) Fêmeas adultas criadas em ninhada normal (n=8).

Avaliamos o ganho de peso dos animais machos NR-G2 e NN-G2 em idade pré-púbere (PND28-32):

- a) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=8);
- b) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=8).

Avaliamos o peso do tecido adiposo: retroperitoneal e perigonadal dos animais machos NR-G2 e NN-G2 em idade pré-púbere (PND28-32):

- a) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=8);
- b) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=8).

Análise do índice de Lee dos animais machos NR-G2 e NN-G2 em idade pré-púbere (PND28-32):

- a) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=8);
- b) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=8).

Análises comportamentais dos machos NR-G2 e NN-G2 na idade pré-púbere (PND28-32):

Comportamento de brincar, reconhecimento de objetos e locomoção no campo aberto:

- a) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=8);

- b) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=8).

Após os testes comportamentais, os animais foram anestesiados para avaliar o índice de *Lee* e decapitados para retirada das estruturas encefálicas córtex pré-frontal e hipocampo para posteriores procedimentos e das gorduras perigonadal e retroperitoneal.

Análise molecular dos machos NR-G2 e NN-G2 na idade pré-púbere (PND28-32):

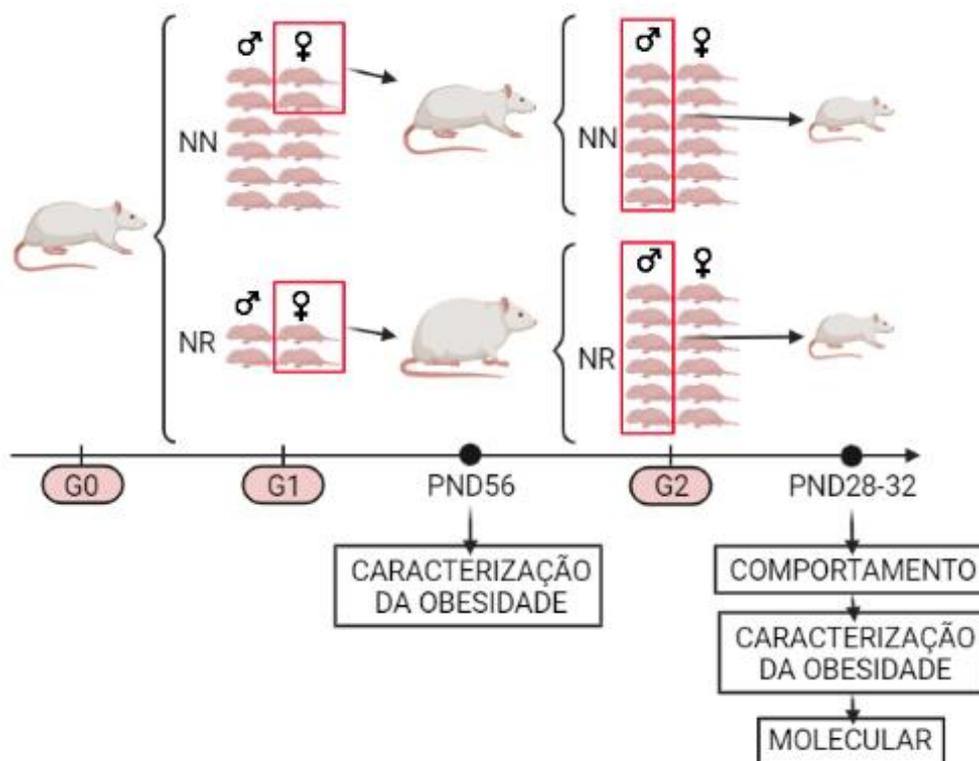
Marcadores epigenéticos (RNA/DNA):

- a) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=5);
- b) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=5).

Marcadores astrogliais, neuroplásticos e sinápticos por Western blot:

- a) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida (n=5);
- b) Filhotes machos provenientes de mães criadas em ninhada normal (n=5).

Figura 7 - Representação esquemática do delineamento experimental



Fonte: Da autora, criado com Biorender.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo software GraphPad versão 8.0 e expressos como média \pm erro padrão da média. Foi aplicado o teste t de Student para comparação de duas médias. Os resultados com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos. O ganho de peso foi analisado através da análise de variância de duas vias para medidas repetidas (2-way RM ANOVA) seguido do pos teste de Bonferroni's usando ninhada (normal e reduzida) e dias (8 ao 56) como fatores.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERIZAÇÃO DA OBESIDADE DE RATAS G1

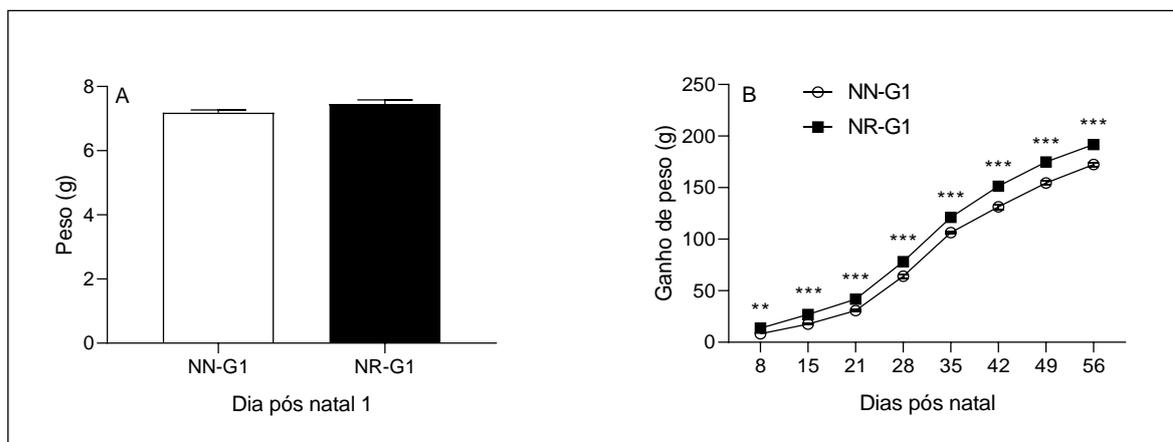
Para caracterização da obesidade avaliamos o ganho de peso do período neonatal até a vida adulta (PND8 – 56), e avaliamos no PND56 o índice de *Lee* e peso do tecido adiposo.

6.1.1 Avaliação do peso das ratas G1

O gráfico 1 mostrou o peso das ratas G1 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida após o nascimento no PND1 (A) e ganho de peso do período neonatal PND8 até a fase adulta PND56 (B),

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferença ($t_{14} = 1,796$; $p > 0,05$, gráfico 1, a) do peso das ratas provenientes do grupo ninhada reduzida comparado com as ratas provenientes do grupo ninhada normal no PND1. Entretanto, a 2-way RM ANOVA mostrou um efeito significativo quanto a ninhada ($F_{(1, 7)} = 256,9$; $p < 0,001$), dias ($F_{(7, 49)} = 6859$, $p < 0,001$) e interação entre esses fatores ($F_{(7, 49)} = 14,26$; $p < 0,001$). O pós teste de Bonferroni's indicou que as ratas provenientes do grupo ninhada reduzida apresentaram um ganho de peso maior do PND8 ao PND 56 ($p < 0,01$ na primeira semana de vida e $p < 0,001$ da segunda semana de vida até a idade adulta, gráfico 2, b) quando comparado com as ratas provenientes do grupo ninhada normal.

Gráfico 1 - Efeito da redução do tamanho da ninhada no ganho de peso das fêmeas do grupo G1



Fonte: Da autora

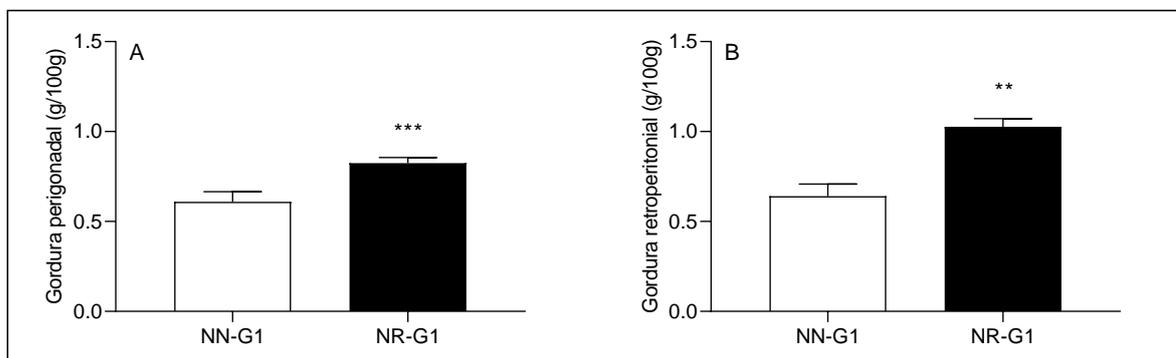
Legenda: N= 8 animais por grupo. A) Peso ao nascer, B) ganho de peso do período neonatal até a idade de acasalamento na vida adulta. NN-G1: criadas em ninhada normal e NR-G1: criadas em ninhada reduzida. Os símbolos representam o nível de significância *** $p < 0.001$ comparado com controle (NN-G1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student e ao 2-way RM ANOVA com valores expressos como média \pm EPM.

6.1.2 Peso do tecido adiposo de ratas adultas – G1

O gráfico 2 mostrou o peso das gorduras perigonadal (A) e retroperitonal (B) no PND56 das ratas G1 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A análise através do teste t para amostras independentes mostrou que os animais do grupo ninhada reduzida apresentaram um aumento da gordura perigonadal ($t_{14} = 4,722$; $p < 0,001$, gráfico 2, a), e da gordura retroperitonal ($t_{14} = 3,373$; $p < 0.01$, gráfico 2, b) quando comparado ao grupo ninhada normal.

Gráfico 2 - Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre a adiposidade ratas adultas (PND56) do grupo G1



Fonte: Da autora

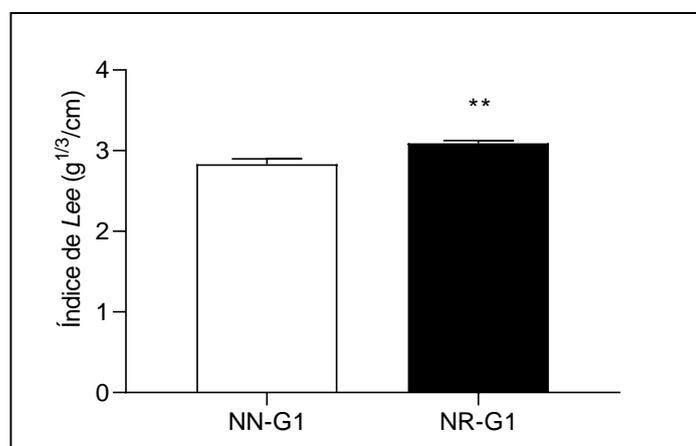
Legenda: N= 8 animais por grupo. Peso das gorduras A) perigonadal, B) retroperitoneal. Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com controle (NN-F1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.1.3 Avaliação do Índice de Lee de ratas adultas – G1

O gráfico 3 mostrou a avaliação do índice de Lee no PND56 das ratas G1 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A análise através do teste t para amostras independentes mostrou que os animais do grupo ninhada reduzida apresentaram um aumento no índice de Lee ($t_{14} = 3,386$; $p < 0,01$, gráfico 3), quando comparado ao grupo ninhada normal.

Gráfico 3 - Efeito da redução do tamanho da ninhada sobre o índice de *Lee* de ratas adultas (PND56) do grupo G1



Fonte: Da autora

Legenda: N= 8 animais por grupo. Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0.01$ comparado com controle (NN-F1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.2 AVALIAÇÃO MACHOS G2

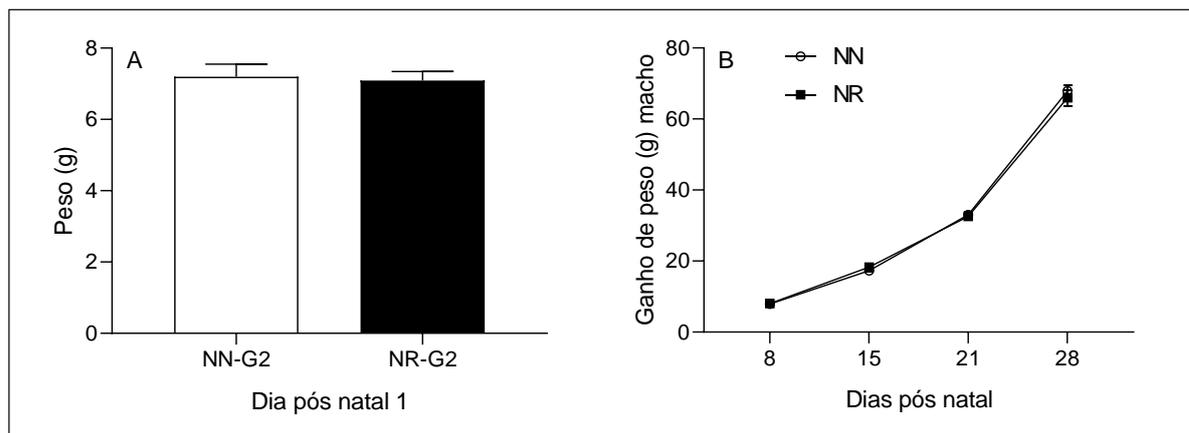
6.2.1 Avaliação do peso – G2

O gráfico 4 demonstra o ganho de peso corporal dos filhotes machos dos grupos NN-G2 e NR-G2 ao nascer no PND1 (gráfico 4, a) e na idade pré-púbere no PND28 (gráfico 4, b).

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferença ($t_{14} = 0,7020$; $p > 0,05$, gráfico 4, a) quando comparamos os machos filhos de mães obesas com seus. Entretanto, a 2-way RM ANOVA mostrou um efeito significativo quanto aos dias ($F_{(3, 21)} = 1576$; $p < 0,001$), porém não apresentou diferenças significativas quanto ao fator ninhada ($F_{(1, 7)} = 0,1071$; $p > 0,05$) e nem na interação entre esses fatores ($F_{(3, 21)} = 0,8095$; $p > 0,05$). O pós teste de

Bonferroni's mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$, gráfico 4, b) do ganho de peso dos filhotes machos de mães obesas quando comparados aos seus controles.

Gráfico 4 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o ganho de peso de seus descendentes machos G2



Fonte: Da autora

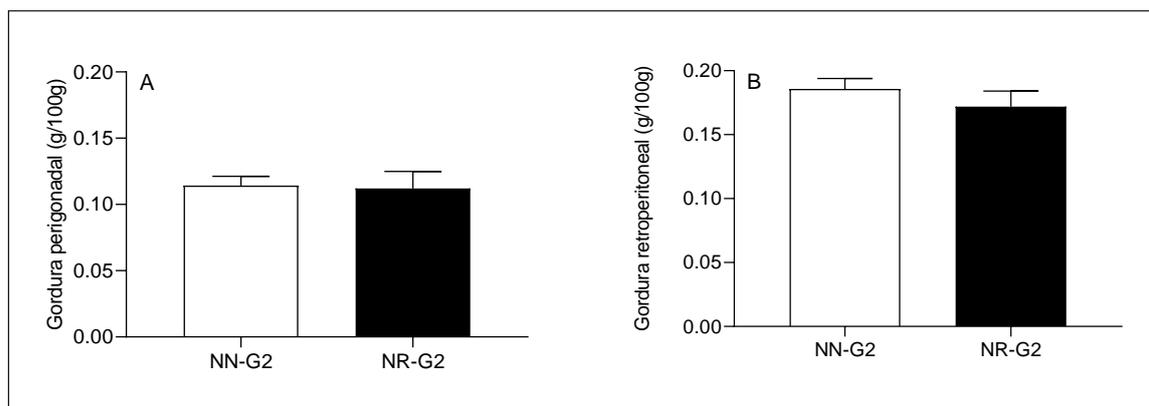
Legenda: N= 8 animais por grupo. A) Peso ao nascer, B) ganho de peso na idade pré-púbere dos filhotes machos do grupo G2. NN-G2: filhotes de mães do grupo NN-G1 (ninhada normal) e NR-G2: filhotes de mães do grupo NR-G1(ninhada reduzida). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student e ao 2-way RM ANOVA com valores expressos como média \pm EPM.

6.2.2 Peso de gorduras - G2

O gráfico 5 mostrou o peso das gorduras dos perigonadal (gráfico 5, a) e retroperitonal (gráfico 5, b) no PND28 de filhotes G2 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferenças nos pesos de gorduras perigonadal ($t_{14} = 0,1501$; $p > 0,05$, gráfico 5, a) e de retroperitonal ($t_{14} = 0,9410$; $p > 0,05$, gráfico 5, b) entre os filhos machos do grupo G2.

Gráfico 5 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o peso das gorduras de seus descendentes machos G2.



Fonte: Da autora

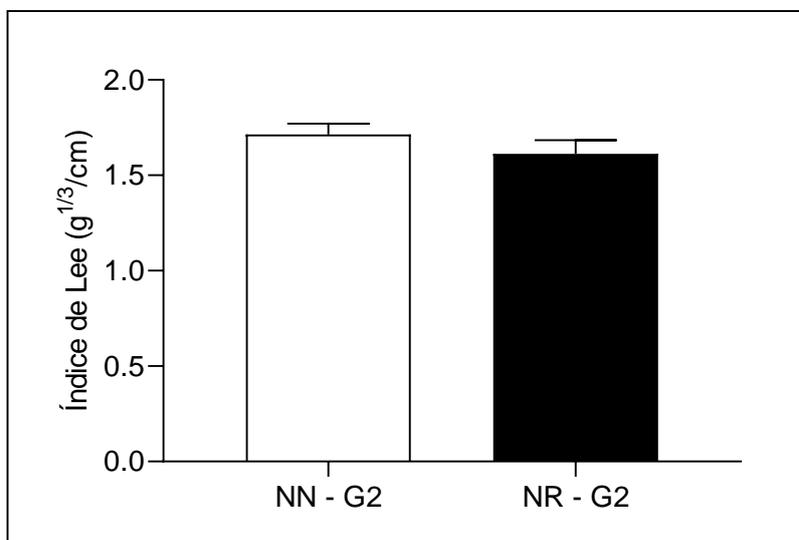
Legenda: N= 8 animais por grupo. A) Peso da gordura perigonadal e B) peso da gordura retroperitoneal de filhotes de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.2.3 Avaliação do Índice de Lee - G2

O gráfico 6 mostrou a avaliação do índice de Lee no PND28 dos ratos G2 dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferença significativa ($t_{14} = 1,140$; $p > 0,05$, gráfico 6) entre os grupos, quando comparado ao grupo controle.

Gráfico 6 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre o Índice de *Lee* de seus descendentes machos G2.



Fonte: Da autora.

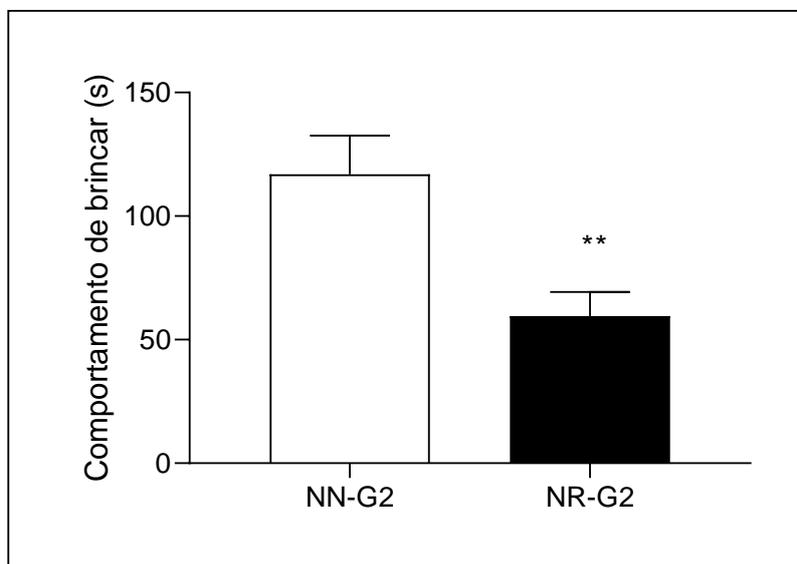
Legenda: N=8 animais por grupo. Índice de *Lee* de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.2.4 Comportamento de brincar – G2

O gráfico 7 demonstra a avaliação do tempo total do comportamento de brincar na idade pré-púbere (PND28-32) de filhote machos provindo de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que houve uma redução ($t_{14} = 3,097$; $p < 0.01$, gráfico 7) no tempo de brincadeira dos filhotes machos provenientes de ratas do grupo ninhada reduzida quando comparados ao controle.

Gráfico 7 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance comportamental no teste de brincadeira e de interação social de seus descendentes machos G2.



Fonte: Da autora.

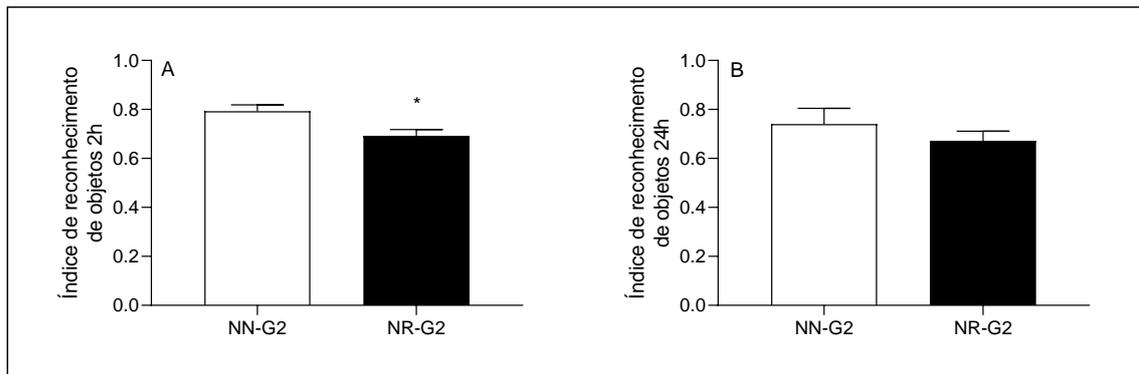
Legenda: N=8 animais por grupo. A) Comportamento social de brincar na idade pré púbere e B) comportamento social na idade adulta de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Valores expressos como média \pm SEM **p < 0.01 quando comparadas as a filhotes do grupo ninhada normal (Teste *T de Student*).

6.2.5 Reconhecimento de objetos – G2

O gráfico 8 mostrou o índice de reconhecimento de objetos de 2h (A) e o índice de reconhecimento de objetos de 24h (B), dos animais machos provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que houve uma redução ($t_{14} = 2,809$; $p < 0.05$, gráfico 8, a) no índice de reconhecimento de objetos de 2h e não observamos diferença ($t_{14} = 0,2790$; $p > 0,05$, gráfico 8, b) no reconhecimento de objetos de 24h, dos machos provindos de mãe do grupo ninhada reduzida quando comparados aos filhotes das ratas do grupo ninhada normal.

Gráfico 8 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a performance de reconhecimento de objetos de descendentes machos G2.



Fonte: Da autora.

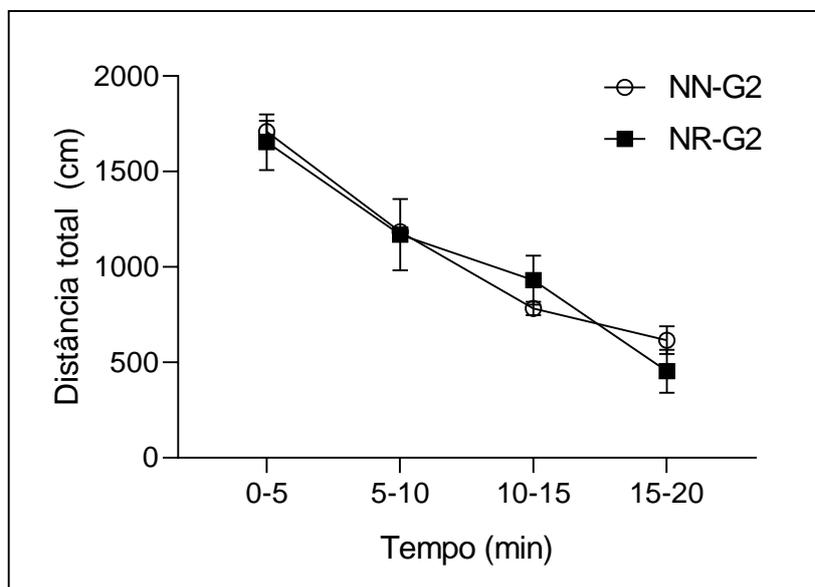
Legenda: N=8 animais por grupo. Índice de reconhecimento de objetos de 2h A) e índice de reconhecimento de objetos de 24h B) de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). O símbolo * representa o nível de significância $p < 0,05$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.2.6 Avaliação da locomoção espontânea – G2

O gráfico 9 mostrou a avaliação da atividade locomotora espontânea dos animais do grupo G2 em idade pré-púbere (PND28-32) no aparato de campo aberto dos filhotes machos provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

A 2-way RM ANOVA mostrou um efeito significativo quanto ao tempo ($F_{(3, 21)} = 75,17$; $p < 0,001$), porém não apresentou diferenças significativas quanto ao fator ninhada ($F_{(1, 7)} = 0,02889$; $p > 0,05$) e nem na interação entre esses fatores ($F_{(3, 21)} = 1,872 = 0,8095$; $p > 0,05$). O pós teste de Bonferroni's mostrou que não houve diferença significativa ($p > 0,05$, gráfico 9) da locomoção dos filhotes machos de mães obesas quando comparados aos seus controles.

Gráfico 9 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a atividade locomotora de seus descendentes machos G2.



Fonte: Da autora.

Legenda: N=8 animais por grupo. Distância total percorrida dos filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os dados foram submetidos à análise de 2-way RM ANOVA com valores expressos como média \pm EPM.

6.3 AVALIAÇÃO MOLECULAR POR PCR – G2

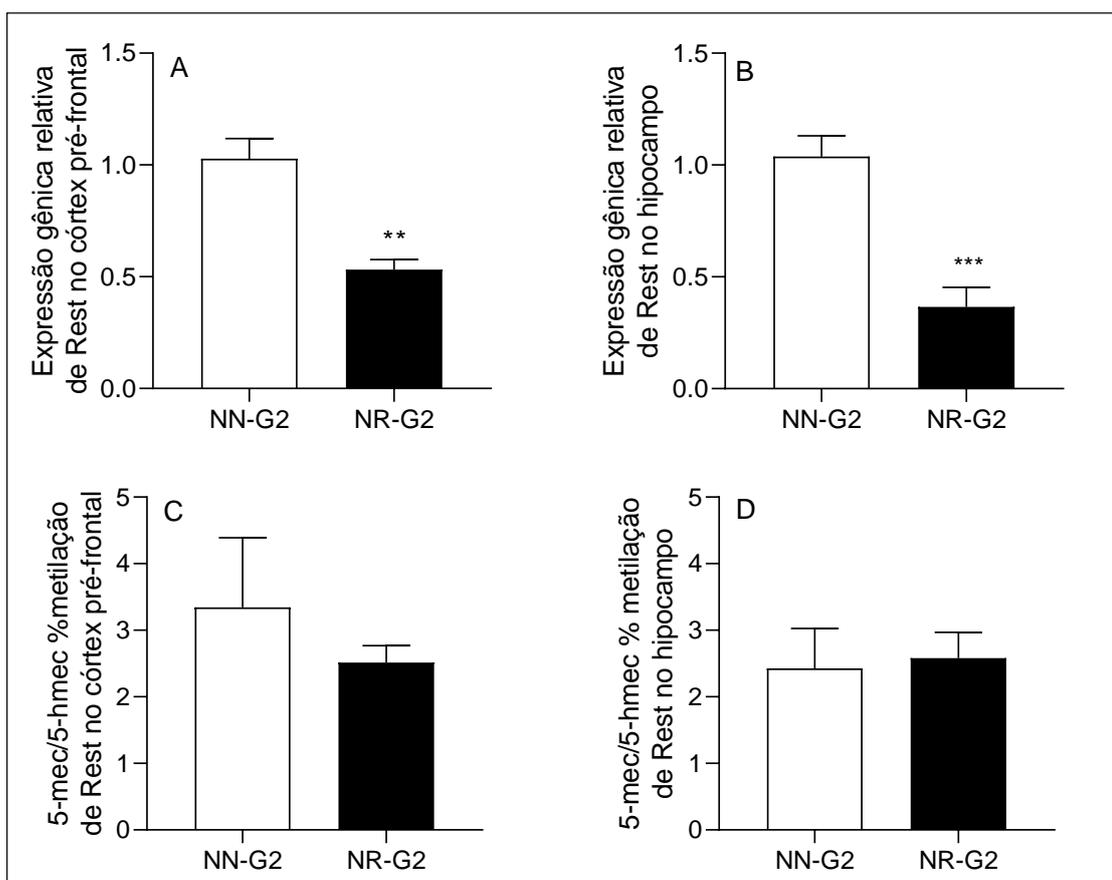
6.3.1 Rest – G2

O gráfico 10 mostrou a expressão gênica do Rest no córtex pré-frontal A) e no hipocampo B) e a metilação do Rest no córtex pré-frontal C) e no hipocampo D) dos filhotes machos do grupo G2 em idade pré-púbere provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que houve uma redução ($t_8 = 4,904$; $p < 0,01$, gráfico 10, a) na expressão gênica de Rest tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo ($t_8 = 5,280$; $p < 0,001$, gráfico 10, b) de machos

provenientes de mães obesas, quando comparado ao controle. Quanto a metilação do Rest, não foi observada diferença no córtex pré-frontal ($t_8 = 0,7744$; $p > 0,05$, gráfico 10, c) e no hipocampo ($t_8 = 0,2169$; $p > 0,05$, gráfico 10, d) dos filhotes machos provenientes de mães obesas, quando comparado ao controle

Gráfico 10 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão e metilação do Rest no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes



Fonte: Da autora.

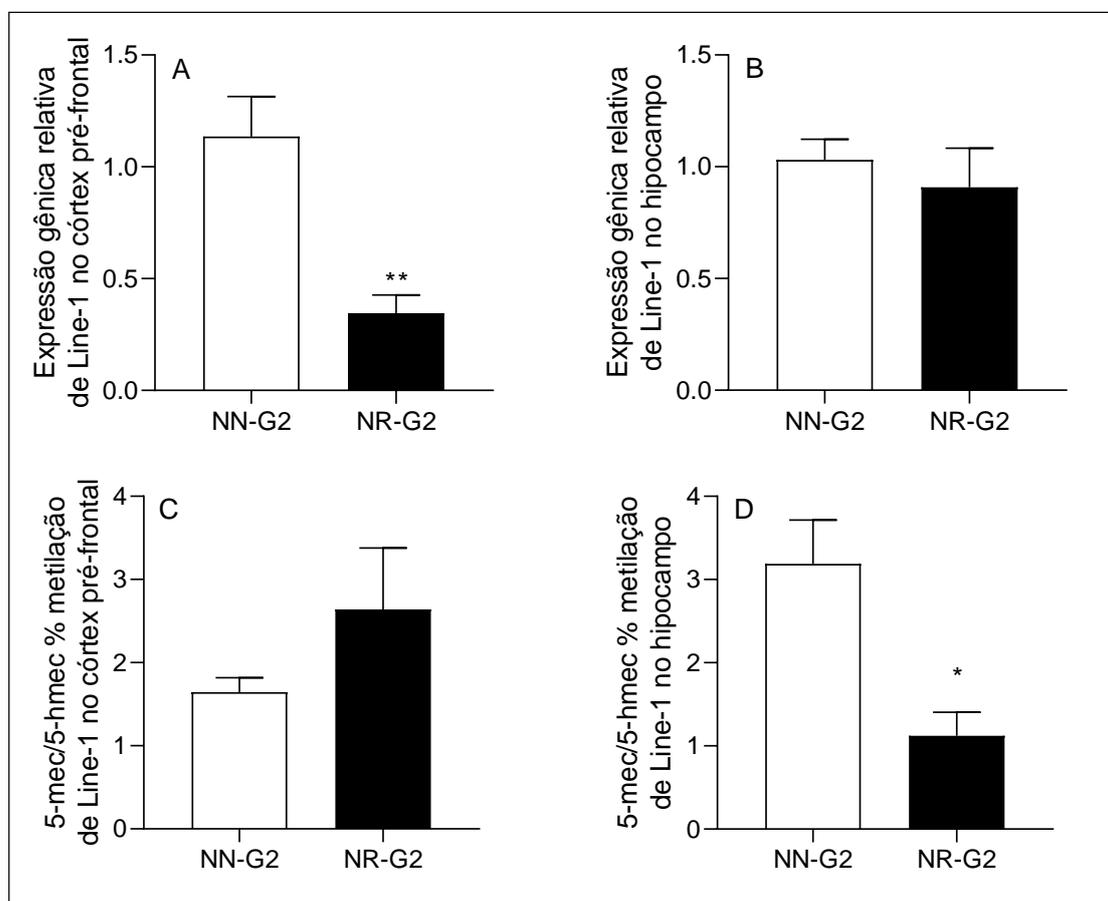
Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão e metilação de Rest em filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ quando comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.2 Line-1 – G2

O gráfico 11 mostrou a expressão gênica do Line-1 no córtex pré-frontal A) e no hipocampo B) e a metilação do Line-1 no córtex pré-frontal C) e no hipocampo D) dos filhotes machos pré-púberes do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que houve uma redução ($t_8 = 4,041$; $p < 0,01$, gráfico 11, a) na expressão gênica de Line-1 no córtex pré-frontal, não apresentou diferença significativa ($t_8 = 0,6132$; $p > 0,05$, gráfico 11, b) na expressão gênica de Line-1 no hipocampo e referente a metilação do Line-1, observamos que não foi encontrada diferença significativa ($t_6 = 1,304$; $p > 0,05$, gráfico 11, c) no córtex pré-frontal, porém, encontramos uma redução da metilação do Line-1 ($t_6 = 3,453$; $p < 0,01$, gráfico 11, d) no hipocampo dos machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 11 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão e metilação do Line-1 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere



Fonte: Da autora.

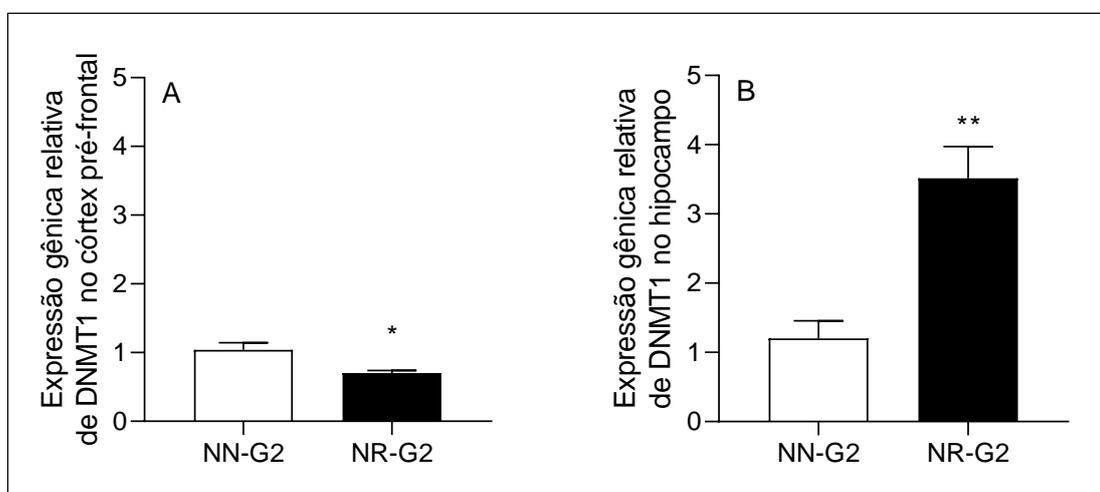
Legenda: N=5 animais por grupo quanto a expressão e N=4 animais por grupo quanto a metilação. Expressão e metilação de Line-1 em filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.3 DNMT1 – G2

O gráfico 12 mostrou a expressão gênica da DNMT1, no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos pré-púberes do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que houve uma redução na expressão gênica de DNMT1 no córtex pré-frontal ($t_8 = 3,042$; $p < 0,05$, gráfico 12, a), já no hipocampo foi observado um aumento ($t_8 = 4,425$; $p < 0,01$, gráfico 12, b) de machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 12 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão das DNMT1 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere.



Fonte: Da autora.

Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão da DNMT1 no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ quando comparados com controles (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

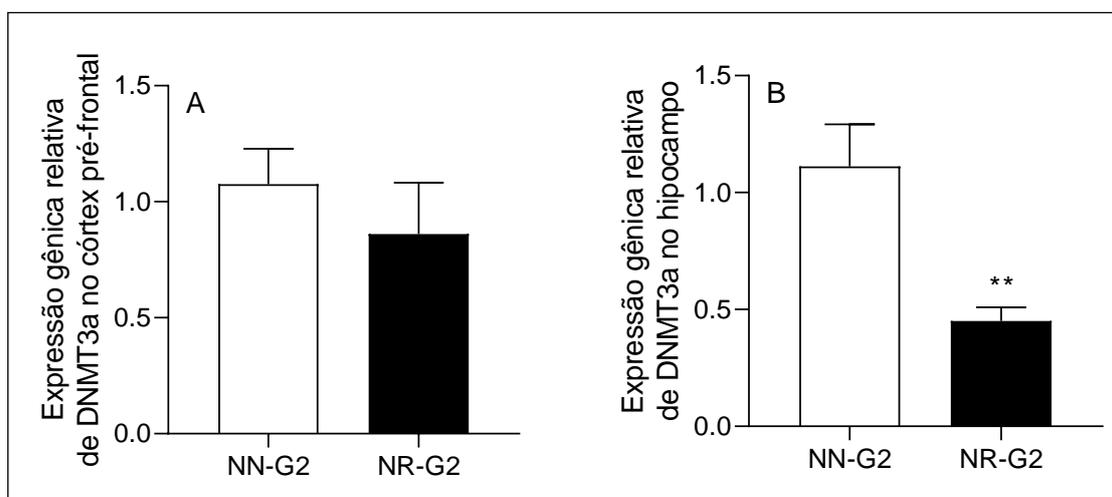
6.3.4 DNMT3a – G2

O gráfico 13 mostrou a expressão gênica da DNMT3a no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos pré-púberes do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferenças significativas ($t_8 = 0,8040$; $p > 0,05$, gráfico 13, a) referente a expressão gênica

da DNMT3a no córtex pré-frontal, entretanto, foi observado uma redução na expressão gênica da DNMT3a no hipocampo ($t_7 = 3,497$; $p < 0,01$, gráfico 13, b) de machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 13 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão das DNMT3a no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere.



Fonte: Da autora.

Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão da DNMT3a no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). O símbolo representa o nível de significância ** $p < 0.01$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

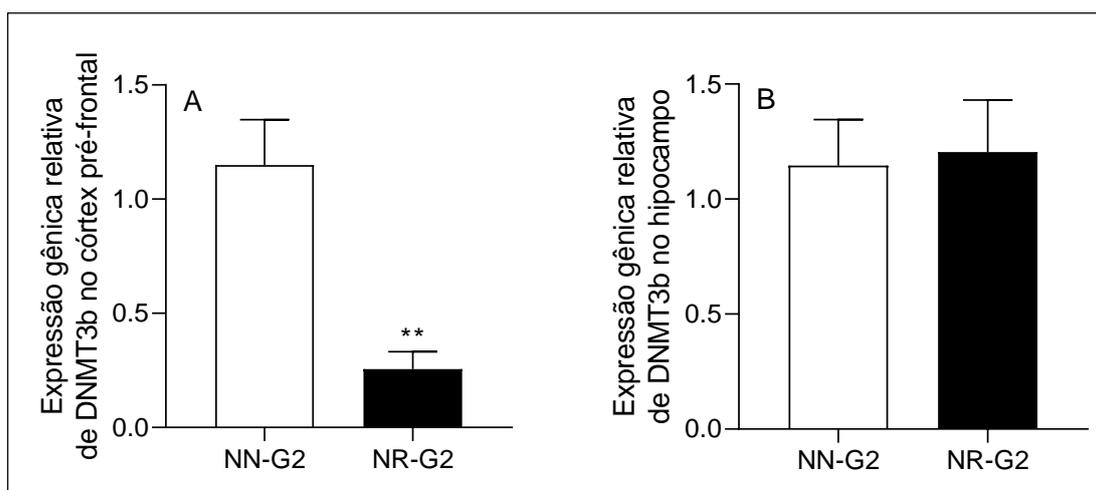
6.3.5 DNMT3b – G2

O gráfico 14 mostrou a expressão gênica da DNMT3b no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos pré-púberes do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que houve uma redução na expressão gênica da DNMT3b no córtex pré-frontal ($t_8 = 4,220$; $p < 0,01$, gráfico

14, a), porém, não foi observado diferença significativa ($t_8 = 0,1925$; $p > 0,05$, gráfico 14, b) no hipocampo de machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 14 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão das DNMT3b no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos em idade pré-púbere.



Fonte: Da autora.

Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão da DNMT3b no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). O símbolo representa o nível de significância ** $p < 0.01$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

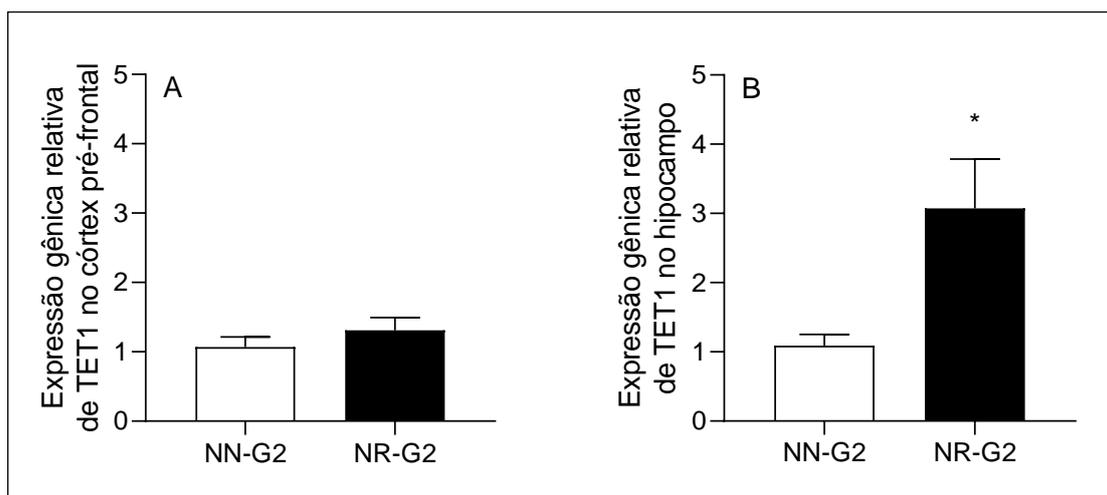
6.3.6 TET1 – G2

O gráfico 15 mostrou a expressão gênica da TET1 no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos em idade pré-púbere do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferenças significativas ($t_8 = 1,045$; $p > 0,05$, gráfico 15, a) na expressão gênica da TET1 no córtex pré-frontal, entretanto, foi observado um aumento ($t_8 = 2,705$; $p < 0,05$, gráfico 15, b) na expressão gênica da TET1 no hipocampo dos machos

provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 15 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão da TET1 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.



Fonte: Da autora.

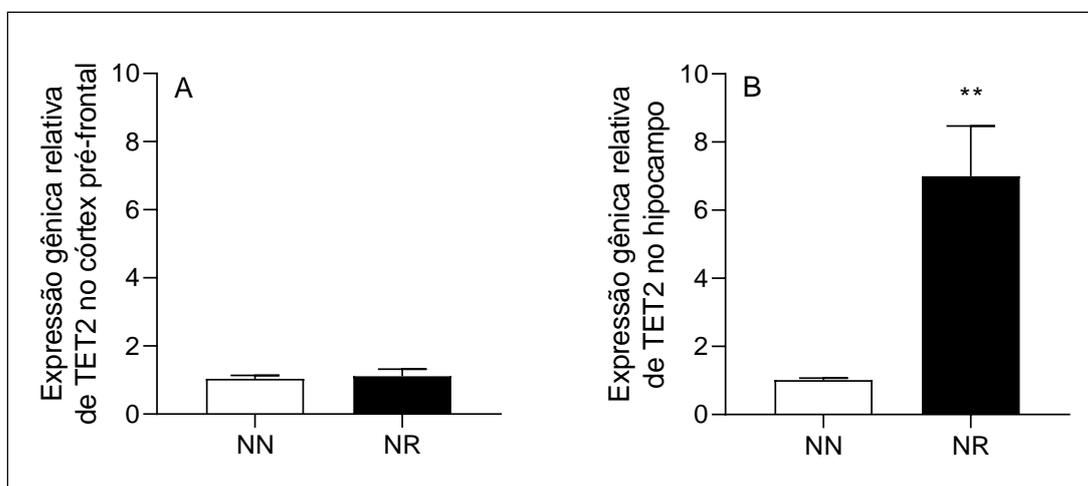
Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão da TET1 no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). O símbolo * representa o nível de significância $p < 0,05$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.7 TET2 – G2

O gráfico 16 mostrou a expressão gênica da TET2 no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos em idade pré-púbere do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferenças significativas ($t_8 = 0,3152$; $p > 0,05$, gráfico 16, a) na expressão gênica da TET2 no córtex pré-frontal, entretanto, foi observado um aumento ($t_8 = 4,049$; $p < 0,01$, gráfico 16, b) na expressão gênica da TET2 no hipocampo dos machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 16 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão da TET2 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.



Fonte: Da autora.

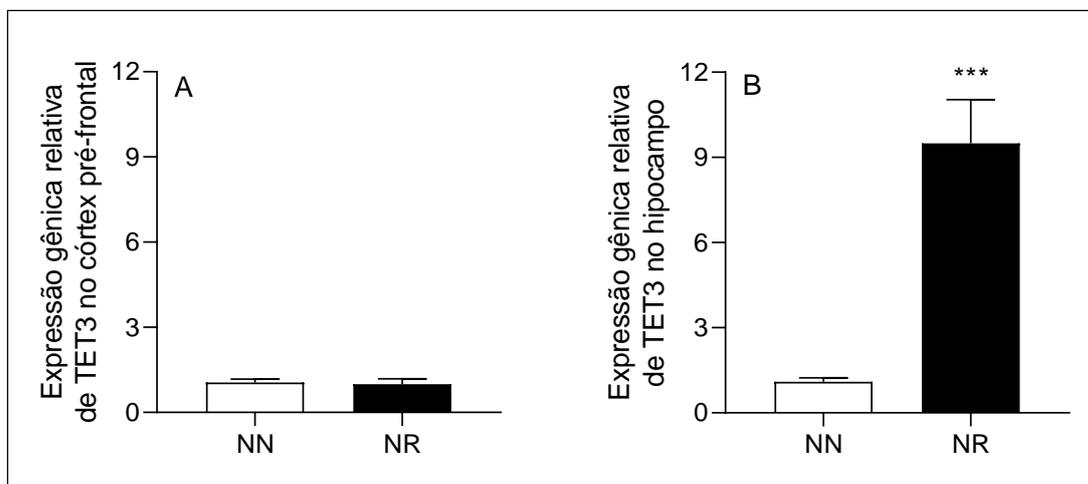
Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão da TET2 no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). O símbolo representa o nível de significância ** $p < 0,01$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.3.8 TET3 – G2

O gráfico 17 mostrou a expressão gênica da TET3 no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos em idade pré-púbere do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que não houve diferenças significativas ($t_8 = 0,2802$; $p > 0,05$, gráfico 17, a) na expressão gênica da TET3 no córtex pré-frontal, porém, foi observado um aumento ($t_8 = 5,439$; $p < 0,001$, gráfico 17, b) no hipocampo dos machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 17 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão da TET3 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.



Fonte: Da autora.

Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão da TET3 no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0,05$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

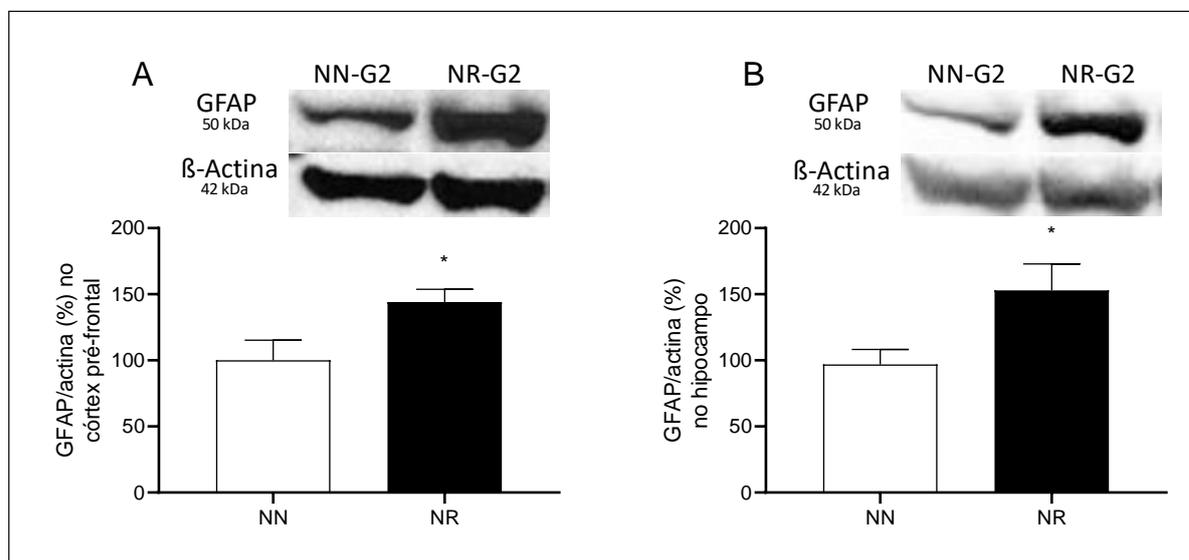
6.4 AVALIAÇÃO MOLECULAR POR WESTERN BLOT – G2

6.4.1 GFAP – G2

O gráfico 18 mostrou a expressão proteica de GFAP no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos pré-púberes do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que a obesidade materna induziu a um aumento na quantidade de GFAP tanto no córtex pré-frontal ($t_{10} = 2,414$; $p < 0,05$, gráfico 18, a) e no hipocampo ($t_{10} = 2,456$; $p < 0,05$, gráfico 18, b) dos machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 18 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.



Fonte: Da autora.

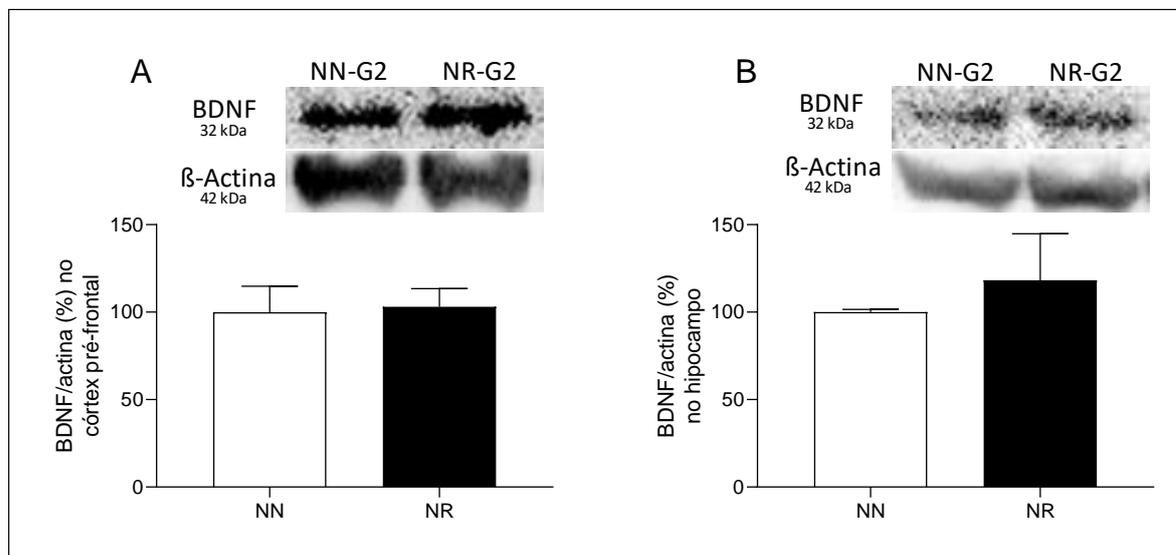
Legenda: N=6 animais por grupo. Expressão proteica de GFAP no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os símbolos representam o nível de significância * $p < 0.05$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.4.2 BDNF – G2

O gráfico 19 mostrou a expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos pré-púberes do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que a obesidade materna induzida por redução no tamanho da ninhada não alterou significamente a expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal ($t_{10} = 0,1683$; $p > 0,05$, gráfico 19, a) e no hipocampo ($t_4 = 0,6778$; $p > 0,05$, gráfico 19, b) dos machos quando comparados aos seus controles

Gráfico 19 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.



Fonte: Da autora.

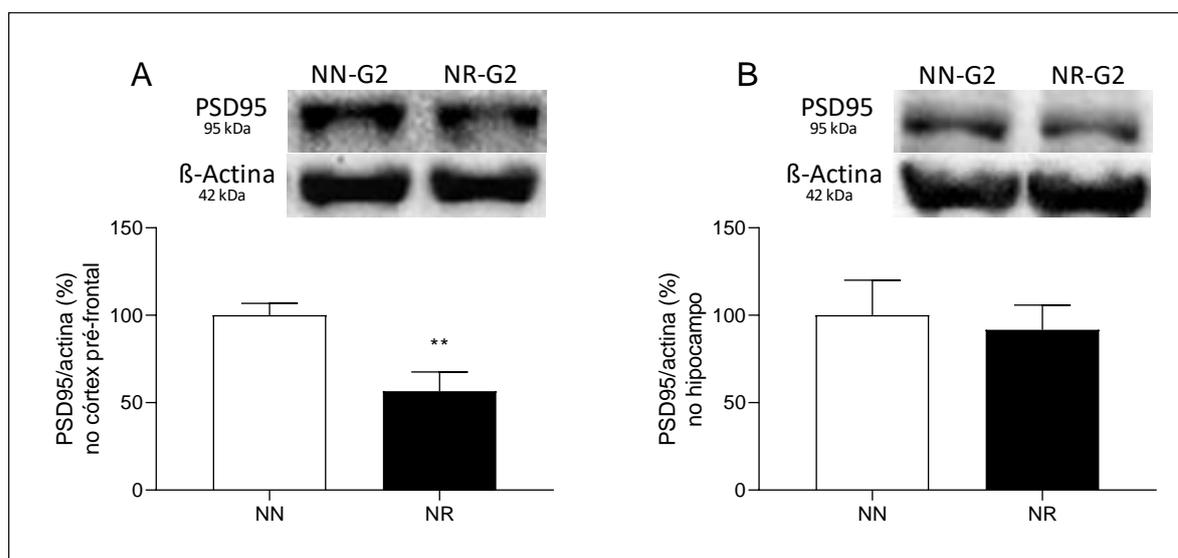
Legenda: Córtex pré-frontal N=6 e hipocampo N=3 animais por grupo. Expressão proteica de BDNF no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.4.3 PSD95 – G2

O gráfico 20 mostrou a expressão proteica de PSD95 no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos do grupo G2 em idade pré-púbere provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

Quanto à expressão proteica de PSD95, o teste t para amostras independentes mostrou que houve uma redução no córtex pré-frontal ($t_{10} = 3,359$; $p < 0,01$, gráfico 20, a) e não houve diferenças no hipocampo ($t_6 = 0,3393$; $p > 0,05$, gráfico 20, b) dos machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 20 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de PSD95 no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.



Fonte: Da autora.

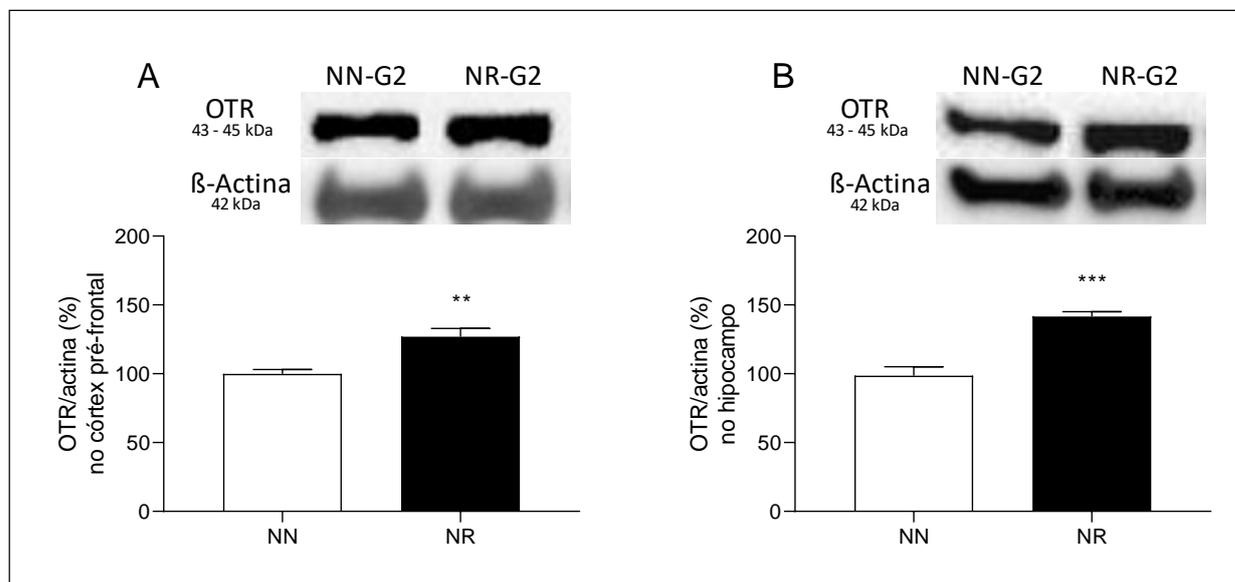
Legenda: Córtex pré-frontal N=6 e hipocampo N=4 animais por grupo. Expressão proteica de PSD95 no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). Os símbolos representam o nível de significância ** $p < 0.01$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.4.4 OTR – G2

O gráfico 21 mostrou a expressão proteica de OTR no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos pré-púberes do grupo G2 provindos de ratas dos grupos ninhada normal e ninhada reduzida.

O teste t para amostras independentes mostrou que houve um aumento ($t_8 = 4,532$; $p < 0,01$, gráfico 21, a) na expressão proteica de OTR no córtex pré-frontal e também mostrou um aumento ($t_8 = 5,904$; $p < 0,001$, gráfico 21, b) no hipocampo dos machos provenientes de mães criadas em ninhada reduzida quando comparado ao controle.

Gráfico 21 - Efeito da obesidade materna induzida por redução de ninhada sobre a expressão proteica de OTR no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes.



Fonte: Da autora.

Legenda: N=5 animais por grupo. Expressão proteica de OTR no córtex pré-frontal e hipocampo de filhotes machos (G2) de mães obesas (NR-G1) e de mães controles (NN-G1). O símbolo representa o nível de significância ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ comparado com controle (NN-G2). Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

6.5 RESUMO DOS RESULTADOS MOLECULARES – G2

Na tabela 2 podemos observar uma tabela com o resumo dos principais resultados moleculares obtidos a partir da comparação entre filhotes machos de mães obesas em idade pré-púberes quando comparados aos seus controles.

Tabela 2 - Resumo dos resultados moleculares dos efeitos da obesidade materna induzida por redução de ninhada no córtex pré-frontal e hipocampo de seus descendentes machos pré-púberes em comparação aos seus controles.

	Córtex pré-frontal	Hipocampo
Line -1 - expressão	▼▼	—
Line -1 - metilação	▲#	▼
Dnmt1	▼	▲▲
Dnmt3a	▼#	▼
Dnmt3b	▼▼	—
TET1	—	▲
TET2	—	▲▲
TET3	—	▲▲▲
Rest - expressão	▼▼	▼▼▼
Rest - metilação	▼#	—
GFAP	▲	▲
BDNF	—	—
PSD95	▼▼	—
OTR	▲▲	▲▲▲

Fonte: Da autora.

Legenda: ▲ representa aumento: (▲ = $p < 0,05$, ▲▲ = $p < 0,01$ e ▲▲▲ = $p < 0,001$), ▼ representa redução: (▼ = $p < 0,05$, ▼▼ = $p < 0,01$, ▼▼▼ = $p < 0,001$), — representa que não houve diferença entre os grupos e # representa tendência. Os dados foram submetidos à análise de Teste T Student com valores expressos como média \pm EPM.

7 DISCUSSÃO

A programação do desenvolvimento cerebral é influenciada pelo ambiente inicial da vida, e perturbações metabólicas nesse período podem ter efeitos de longo prazo (SOCH, *et al.*, 2019).

Estudos utilizando a redução do tamanho da ninhada para induzir a obesidade precoce, mostraram que esse método de reprogramação neonatal foi eficaz para manter o roedor obeso até a idade adulta e foi capaz de causar perturbações metabólicas na idade adulta (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2011; ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018; SOCH, *et al.*, 2019; SOCH, *et al.*, 2019).

Em nosso trabalho, observamos que o método de redução do tamanho de ninhada no período neonatal das ratas G1, fez com que o grupo NR-G1 apresentasse um aumento no ganho de peso a partir da primeira semana de vida (PND8) e esse aumento se manteve até a vida adulta no PND56, sendo observado também um aumento no Índice de *Lee* e no peso das gorduras perigonadal e retroperitoneal.

Como demonstrado também em um estudo com ratas *Wistar*, utilizando a redução do tamanho da ninhada na proporção de 3 filhotes para o grupo ninhada reduzida e 12 filhotes para o grupo ninhada normal, observaram que os filhotes criados em ninhada reduzida tinham um maior ganho de peso desde as primeiras semana de vida e que na vida adulta, apresentando um maior índice de *Lee*, maior adiposidade, além de apresentarem dislipidemia, hiperleptinemia, hiperinsulinemia e hiperglicemia, tanto os machos quanto as fêmeas adultos (ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018).

A redução do tamanho da ninhada de ratas *Wistar* na mesma proporção utilizada em nosso estudo, 4 filhotes para ninhada reduzida e 12 filhotes para ninhada normal, demonstrou ser eficaz como modelo de estudo de obesidade na vida adulta, podendo ser observado um aumento no ganho de peso até a vida adulta juntamente com aumento da adiposidade e com uma a resposta

imunológica exacerbada em adultos criados em ninhada reduzida quando comparados ao controle. (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2011; SOCH, *et al.*, 2019).

Sosh e colaboradores (2019) mostraram que a superalimentação neonatal leva à microgliose e resposta microglial exacerbada ao LPS, que é uma endotoxina bacteriana lipopolissacarídica no hipocampo e no hipotálamo, e apresentando um maior pico febril após o desafio imunológico com LPS, maior produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina – 6 (IL6) e interleucina 1 (IL-1) e uma expressão elevada de receptores toll-like (TLR) 2 e 4 no tecido adiposo. A elevada expressão de TLR4 está correlacionada com um aumento na fosforilação de I κ B, sugerindo um aumento na disponibilidade do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) para iniciar a transcrição de citocinas (CLARKE; STEFANIDIS; SPENCER, 2011).

Sabe-se que na resposta imune inata, o LPS é um ligante autêntico para TLR4. Porém, evidências científicas demonstraram o papel do TLR4 na inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade, visto que o TLR4 é crucial para a mudança fenotípica dos macrófagos para se tornarem macrófagos pró-inflamatórios no tecido adiposo e que a deficiência de TLR4 atenua a inflamação do tecido adiposo induzida pela obesidade e a resistência sistêmica à insulina em camundongos (HACHIYA *et al.*, 2022).

Estudos vem demonstrando que os ácidos graxos saturados (SFAs) derivados de adipócitos, como palmitato e estearato, controlam a inflamação associada à obesidade, ligando-se ao TLR4, ativando a via NF κ B e aumentando a expressão de genes que codificam proteínas com ação pró-inflamatória, enquanto, a suplementação com ácidos graxos poliinsaturados, como o EPA - ácido eicosapentaenóico e o DHA - ácido docosahexaenóico, neutralizam os efeitos dos SFAs, inibindo a via NF κ B (HACHIYA *et al.*, 2022; ROGERO; CALDER, 2018).

Em gestações obesas, pode-se observar um efeito lipotóxico que promove inflamação, disfunção endotelial e prejudica a invasão placentária, sendo a sinalização de insulina é importante para o crescimento e desenvolvimento placentário. A obesidade materna com resistência à insulina e hiperinsulinemia

está associada a um perfil de expressão gênica placentária característico de disfunção mitocondrial e distúrbios no metabolismo de ácidos graxos, o que pode afetar o suprimento de nutrientes para o feto, além disso, há evidências de um dimorfismo sexual nas respostas adaptativas da placenta (REICHETZEDER, 2021).

Sendo assim, diante do aumento de peso desde a primeira semana de vida, aumento do índice de *Lee* e aumento do peso das gorduras perigonadal e retroperitonial das ratas NR-G1 na vida adulta pode-se sugerir que a redução da ninhada realizada no nosso estudo foi capaz em induzir a obesidade materna.

Observando evidências na literatura onde demonstram que a redução no tamanho da ninhada leva a prejuízos metabólicos que se mantem até a vida adulta com aumentos dos níveis de insulina e de glicemia, especulando que tal situação seja semelhante a um quadro de resistência à insulina e que a resistência à insulina está associada com disfunção placentária, e tal disfunção está envolvida com respostas adaptativas da placenta e com o dimorfismo sexual, sugerimos que tal disfunção poderia ser responsável pelas alterações comportamentais encontradas em nosso estudo anterior, onde observamos que filhos machos de mães obesas apresentavam alterações comportamentais semelhantes ao TEA (ENES-MARQUES; GIUSTI-PAIVA, 2018; REICHETZEDER, 2021; WU *et al.*, 2023).

Levando também em consideração que a ativação imune-materna por LPS durante a gestação é um modelo clássico para o estudo dos comportamentos semelhantes ao TEA e que os SFAs derivados dos adipócitos ativam o receptor TLR4 (CARBONE *et al.*, 2023; KIRSTEN *et al.*, 2015; ROGERO; CALDER, 2018; HACHIYA *et al.*, 2022; VITOR-VIEIRA; VILELA; GIUSTI-PAIVA, 2021;).

Sugerimos que as alterações comportamentais e neurais encontradas em nosso trabalho nos machos filhos do grupo NR-G2 foram provocadas por um complexo envolvimento da obesidade gerando uma reprogramação neonatal, afetando o neurodesenvolvimento.

Ao analisar os descendentes de mães obesas, o grupo NR-G2, vimos que na idade pré-púbere a obesidade materna não induziu a obesidade nos mesmos,

pois não houve alteração do peso ao nascer, no ganho de peso, no índice de *Lee* e no peso das gorduras retroperitoneal e perigonadal, porém, observamos alterações comportamentais.

Em nosso estudo anterior, com o mesmo modelo de indução de obesidade apresentada no estudo atual, observamos que os filhotes machos de mães obesas apresentavam uma redução na vocalização ultrassônica, redução no comportamento social de brincar, uma maior preferência pelo objeto familiar ao roedor em curto prazo, além de um aumento do comportamento repetitivo / estereotipado nos machos pré-púberes (DE NOVAIS *et al.*, 2021).

Em nosso estudo atual, observamos uma redução no comportamento social de brincar e uma maior preferência ao objeto que é familiar ao roedor, demonstrando assim, que o modelo de obesidade materna utilizada em nosso trabalho foi capaz de replicar a alteração comportamental semelhante ao autismo encontrada anteriormente, sugerindo que a obesidade materna induzida por redução do tamanho da ninhada possa ser um modelo eficiente para estudo do TEA.

Existe um crescente interesse na literatura em entender as consequências da obesidade materna em seus descendentes, sendo já bem demonstrado que a obesidade materna afeta no neurodesenvolvimento de seus descendentes, tendo uma relação crescente em humanos entre a obesidade materna e o TEA em seus descendentes, porém, essa relação em modelos animais é escassa (EDLOW, 2017).

Um dos possíveis mecanismos neurobiológicos pelos quais a supernutrição materna pode perturbar a função cognitiva, o estado afetivo e o comportamento psicossocial da prole é a neuroinflamação, a interrupção dos circuitos e conectividade neurais e hormônios cerebrais desregulados (HASEBE; KENDIG; MORRIS, 2021).

Segundo Dunn e colaboradores (2022) a neuroinflamação provocada pela obesidade materna é um dos principais alvos de estudo como mecanismo subjacente para alterações do neurodesenvolvimento na prole. Os astrócitos são células gliais com funções críticas na manutenção da homeostase fisiológica

dentro do SNC, com importantes papéis no suporte da função neuronal, transmissão glial e sinalização via liberação e captação de Ca^{2+} e está envolvido na regulação da função sináptica e de processos inflamatórios. GFAP é uma proteína presente em astrócitos reativos, sendo seu aumento relacionado a neuroinflamação tanto em tecidos humano pós-morte de indivíduo com TEA, quanto em modelos animais utilizados para estudar o TEA (MATTA; HILL-YARDIN; CRACKA, 2019).

Como foi demonstrado do trabalho de Crawford e colaboradores (2015) que analisou a quantidade de GFAP no córtex pré-frontal de 14 homens pós-morte diagnosticados com TEA.

Em nosso estudo observamos um aumento da quantidade de GFAP tanto no córtex pré-frontal quanto no hipocampo dos machos, tais achados sugerem que a obesidade materna por redução do tamanho da ninhada induziu uma neuroinflamação em estruturas encefálicas dos seus descendentes masculinos podendo ser um dos principais fatores para o desenvolvimento do comportamento semelhante ao autismo encontrados nesse trabalho.

Avaliamos também os fatores neurotróficos (BDNF), que são proteínas secretadas que promovem o desenvolvimento e manutenção das funções neurais, sendo a alteração dos seus níveis relacionados com o TEA em humanos e em modelos animais (DOMINIK; SCHMEISSER, 2017).

Enquanto o estudo de Koh e colaboradores (2014) mostravam que o aumento de BDNF poderia ter relação com a hiperconectividade neural em indivíduos com TEA, Robinson-Agramonte e colaboradores (2022) relatam que não houve alteração nos níveis de BDNF e uma redução nos níveis de próBDNF em indivíduos com TEA.

Assim como outro estudo randomizado com mais de 20.000 participantes de um banco de dados que tem alguns distúrbios neuropsiquiátricos, incluindo esquizofrenia e transtorno do espectro autista, não encontraram alterações significativas nos níveis de BDNF (WILLIAMS *et al.*, 2022).

Já em outro estudo com 65 pacientes com TEA, sendo 51 meninos, com idade média de 11,7 anos, observaram um aumento nos níveis de BDNF, porém não encontraram diferenças nos níveis de próBDNF (BRYN *et al.*, 2015).

Em nosso trabalho não encontramos alterações nas quantidades de próBDNF no córtex pré-frontal e no hipocampo de filhotes machos de mães obesas quando comparados ao controle, mesmo que os estudos relacionando os níveis de BDNF sejam totalmente diferente entre si e com o nosso trabalho, há um consenso sobre a importância do BDNF no neurodesenvolvimento, e como o nosso trabalho não apresentou alterações nos níveis de BDNF, sugerimos que as alterações do neurodesenvolvimento encontradas no nosso trabalho não foram provocadas por alterações nos níveis de BDNF.

Analizamos também a quantidade da proteína de densidade pós-sináptica-95 (PSD95) que vem sendo muito estudada por ser um importante regulador nas sinapses excitatórias por interagir e estabilizar os receptores NMDARs (receptores de ácido N-metil-d-aspartico) e AMPARs (receptores de ácido isoxazolepropionico), sendo sua alteração, uma das principais etiologias para distúrbios do neurodesenvolvimento como esquizofrenia e TEA (COLEY; GAO, 2018).

A plasticidade sináptica desregulada é uma característica fundamental dos distúrbios do neurodesenvolvimento, incluindo o autismo. Para avaliar o envolvimento do PSD95 na regulação sináptica, os autores utilizaram células neurais do hipocampo de camundongos e observaram que quando a célula é tratada com uma substância que faz aumentar a expressão de PSD95, a expressão da proteína de retardo mental X frágil (FMRP) foi reduzida, além de reverter os déficits comportamentais em camundongo com comportamento semelhante ao autismo (CHEN *et al.*, 2022).

As mutações monogênicas de Shank3 vem sendo muito estudadas pois levam ao desenvolvimento do TEA. Shank3 é uma proteína presente na membrana pós-sináptica que se junta a outras proteínas como a PSD95 para dar suporte aos receptores de NMDA. Em camundongos nocaute a Shank3, um modelo animal utilizado para estudo do TEA a reparação da integridade desse complexo constituído por Shank3, PSD95 e outras proteínas de andaime,

chamadas receptossomo de glutamato, resgatou transmissão sináptica, plasticidade e algumas características comportamentais de camundongos Shank3 (MOUTIN *et al.*, 2021).

No nosso trabalho encontramos uma redução na quantidade de PSD95 no córtex pré-frontal dos filhotes machos de mães obesas. Sabendo que o córtex pré-frontal é uma área encefálica importante para o comportamento, sugerimos que as alterações comportamentais encontradas em nosso trabalho possam ter o envolvimento da redução da PSD95 nessa área cortical.

A ocitocina vem sendo estudada em modelos animais para estudo de distúrbios do neurodesenvolvimento como o TEA por sua deficiência estar relacionada com os comportamentos sociais alterados em animais para estudo do TEA. (REICHOVA *et al.*, 2020; TSUJI, FUJISAKU; TSUJI, 2020; GOTTLIEB, 2019).

Como demonstrado em um estudo onde utilizaram células neuronais do hipocampo de camundongos nocaute a Shank3, uma proteína que é muito estudada em modelos animais para estudo do TEA, observaram que após o tratamento com ocitocina, os níveis de Sinapsina 1, PSD95 e Neurogin 3 foram compensados, sugerindo que as patologias sinápticas podem ser revertidas com o tratamento de ocitocina (REICHOVA *et al.*, 2020).

Em nosso estudo observamos uma maior quantidade de receptores de ocitocina. Especulamos que essa maior expressão de receptores de ocitocina no córtex pré-frontal e no hipocampo dos machos seja provocada por uma menor disponibilidade de ocitocina na fenda sináptica. Assim, sugerimos que mais estudos devem ser feitos, principalmente com tratamento de ocitocina nos filhotes machos de mães obesas para entender melhor o papel da ocitocina neste modelo animal.

Tais achados são importantes para entender como a obesidade materna que foi induzida por redução de ninhada induz comportamento tipo autista em seu descendente macho e também lança luz em vários pontos terapêuticos, como a ocitocina ou suplementos anti-inflamatórios por exemplo.

A incidência crescente de Transtorno do Espectro Autista (TEA) nas últimas duas décadas tem impulsionado estudos sobre os fatores etiológicos não genéticos que podem contribuir para a sua manifestação. Entre esses fatores, a epigenética tem sido investigada devido à sua capacidade de afetar a expressão gênica sem alterações na sequência de DNA. A metilação anormal do DNA, em particular, tem sido associada ao desenvolvimento do TEA. Além disso, as interações ambientais também têm sido consideradas como um possível fator de risco para o TEA (GAWLIŃSKA *et al.*, 2021).

Assim, avaliamos alguns marcadores epigenéticos, pois já está bem estabelecido na literatura que fatores ambientais como a obesidade materna podem contribuir para o desenvolvimento do TEA e a investigação de tais fatores na idade precoce podem auxiliar na compreensão sobre a etiologia do TEA, assim como no desenvolvimento para biomarcadores para sua predição (BANIK *et al.*, 2017; LOKE; HANNAN; CRAIG, 2015).

A metilação do DNA é um mecanismo importante para avaliar a atividade do DNA, já que o processo de metilação do DNA inativa às áreas CpGs metiladas e para isso, avaliamos a expressão e metilação de Line-1 assim como as enzimas que metilam e desmetilam o DNA (FENG; LOU, 2019; JASOLIYA *et al.*, 2022).

A expressão de elemento-1 intercaladas longas (Line-1), são uma fonte ativa de mosaïcismo genômico que está desregulado em várias doenças neurológicas (FONTANA *et al.*, 2021).

A alta expressão de Line-1 parece estar envolvida ao desenvolvimento de vários transtornos mentais como o TEA, esquizofrenia, transtorno bipolar, depressão maior e doença de Alzheimer e por regular as respostas imuno-inflamatórias (MISIAK; RICCERI; SAŚIADEK, 2019).

LINE-1 tem sido estudado como um marcador epigenético para avaliar a metilação global do DNA em várias doenças, incluindo o câncer e o autismo. No câncer, a hipometilação do DNA tem sido associada a uma maior instabilidade genômica e ao desenvolvimento de certos tipos de câncer. Em relação ao autismo, estudos sugerem que a hipometilação do DNA pode estar associada a

uma maior suscetibilidade genética e a alterações no desenvolvimento do cérebro (MCKEE *et al.*, 2018; XIAO-JIE *et al.*, 2016).

Além disso, a redução da metilação global do DNA tem sido observada em estruturas encefálicas de descendentes de mães alimentadas com dieta rica em gordura durante a gestação e lactação (URBONAITE *et al.*, 2022).

Porém, a hipermetilação global do DNA também está associada ao TEA, como demonstrado em um estudo onde observou que o córtex pré-frontal de machos em idade pré-púbere filhos de mães que foram alimentadas durante a gestação e a lactação com dieta rica em gordura estava hipermetilado (GAWLIŃSKA *et al.*, 2021).

Em nosso estudo observamos uma redução na expressão de Line-1 e uma tendência no aumento da metilação da região promotora de Line-1 no córtex pré-frontal e no hipocampo foi observamos que não houve diferença significativa na expressão, poré,.houve uma redução da metilação da região promotora de Line-1. Tais achados vão de encontro aos dados da literatura mostrando que a alteração na metilação global do DNA, em nosso trabalho observada pela metilação de Line-1 pode causar instabilidade genômica, tanto a hipometilação, quanto a hipermetilação do DNA.

O adequado equilíbrio entre os processos de metilação e desmetilação do DNA é fundamental para o desenvolvimento saudável do cérebro. Assim, mudanças na expressão de enzimas que controlam os padrões de metilação do DNA podem contribuir para a origem de transtornos do neurodesenvolvimento, como é o caso do autismo. Pesquisas recentes têm investigado a relação entre a disfunção desses processos epigenéticos e o desenvolvimento de características comportamentais e cognitivas associadas ao TEA, com o objetivo de compreender melhor os mecanismos subjacentes à doença (SRANCIKOVA *et al.*, 2021).

Em nosso trabalho analisamos a expressão das enzimas que metilam (DNMTs) e desmetilam (TETs) o DNA e observamos diferentes resultados nas estruturas encefálicas analisadas. No córtex pré-frontal observamos uma redução da Dnmt1 e da Dnmt3b e observamos uma tendência a reduzir da Dnmt3a,

entretanto não observamos diferenças nas enzimas que desmetilam o DNA (TETs), já no hipocampo, foi observado um aumento na expressão de Dnmt1, uma redução da Dnmt3a, e não houve diferença na Dnmt3b, enquanto as TETs (1, 2 e 3) estavam todas com a expressão aumentada em ratos machos provindos de mães obesas.

Em um estudo que avaliou as alterações na expressão dos genes das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) no cérebro de camundongos com deficiência em SH3 e múltiplos domínios de repetição de anquirina 3 (Shank3) durante o desenvolvimento inicial. Camundongos com deficiência de Shank3 são amplamente utilizados como modelo transgênico para investigar os mecanismos moleculares subjacentes aos sintomas do autismo. As DNMTs são responsáveis por modular vários processos celulares durante o neurodesenvolvimento e sua disfunção está associada à fisiopatologia do autismo. Observaram neste estudo uma redução da Dnmt1 e Dnmt3b, sugerindo que alterações no gene Shank3 estão associadas a mudanças na expressão de enzimas de metilação do DNA nos estágios iniciais do desenvolvimento do cérebro. Portanto, é importante investigar mais a fundo os mecanismos de controle epigenético em modelos relevantes para o autismo (SRANCIKOVA *et al.*, 2021).

A dieta materna rica em gordura durante a gestação e lactação de ratas *Wistar* também foi capaz de influenciar na redução da DNMT3b no córtex pré-frontal de machos em idade pré-púbere que estavam com comportamento semelhante ao TEA (GAWLIŃSKA *et al.*, 2021).

Assim podemos sugerir que a obesidade materna provoca alterações na expressão das enzimas importantes para a maquinaria epigenética no encéfalo do seu descendente macho semelhante às alterações encontradas em camundongos deficientes de Shank3 que são utilizados para entender o TEA e em filhos machos de mães alimentadas durante a gestação e lactação com dieta rica em gordura que apresentavam comportamento semelhante ao TEA, podendo ser um fator importante pela alteração na metilação global do DNA e o desenvolvimento de comportamento semelhante ao TEA encontrada em nossos animais machos filhos de mães obesas.

Porém, como ainda não está claro na literatura os mecanismos pelos quais a expressão dessas enzimas está desregulada no TEA, avaliamos a expressão e metilação da região promotora de Rest.

Rest (Repressor Element 1 Silencing Transcription factor; também chamado de Neuron Restrictive Silencer Factor - NRSF) é considerado um regulador transcricional crítico para o desenvolvimento e homeostase neural (WANG *et al.*, 2016).

Assim, novos estudos vêm sugerindo que a desregulação do fator silenciador Restritivo de neurônios (NRSF/Rest) exerce um papel importante nos mecanismos epigenéticos em modelos animais e em indivíduos com TEA (KAWASE, *et al.*, 2018).

O Rest está ligado a expressão de AUTS2, um gene ativador de transcrição e regulador de desenvolvimento do autismo e de NRXN 1, gene que codifica neuroxina, uma proteína de membrana que se liga a neuroligina para formar complexos neuroxina/neuroligina dependentes de Ca^{2+} nas sinapses do sistema nervoso central, sendo este complexo necessário para a neurotransmissão eficiente (BIEL *et al.*, 2022; WANG *et al.*, 2016)

Em nosso estudo anterior observamos uma redução da quantidade de sinaptofisina no hipocampo dos machos, e em nosso estudo atual observamos uma redução na expressão de Rest tanto no córtex pré-frontal, quanto no hipocampo e não observamos diferenças na metilação do Rest nessas mesmas estruturas encefálicas (DE NOVAIS *et al.*, 2021).

Como o Rest está ligado a expressão de genes envolvidos com o desenvolvimento do autismo e com a transmissão sináptica e em nossos estudos demonstramos que os machos filhotes de mães obesas apresentavam comportamento semelhante ao autismo e déficits na neurotransmissão com a baixa quantidade de sinaptofisina, uma proteína da membrana da vesícula pré-sináptica que é normalmente usada como marcador de vesícula pré-sináptica, sugere-se que a redução da expressão de Rest encontrada em nosso trabalho tenha relação com o desenvolvimento dos sintomas semelhantes ao autismo em

filhotes machos de mães obesas, assim como com os déficits na neurotransmissão.

Porém, são necessários mais estudos para elucidar melhor essa relação, pois a relação da expressão de Rest em modelos animais para estudo do autismo não está bem estabelecida, como demonstrado em um estudo que observaram um aumento dos níveis de NRSF/Rest em camundongos induzidos ao comportamento semelhante ao autismo com a administração de ácido valpóico no 12º e meio dia de gestação e tiveram a análise dos níveis de NRSF/Rest quando adultos, com 8 semanas de vida (KAWASE, *et al.*, 2018).

Em um estudo com cultura de células de pacientes com TEA, depressão e células mutantes para o gene eucromatina histona metil transferase 1 (EHMT1), um repressor epigenético ligado a distúrbios do neurodesenvolvimento que regula a expressão de NRSF/Rest, mostrou que a expressão e quantificação de NRSF/Rest estavam reduzidos (ALSAQATI, *et al.*, 2022).

Assim, podemos concluir que a alteração na expressão de Rest parece estar envolvida com a regulação da maquinaria epigenética e na transcrição de proteínas relacionadas com o desenvolvimento do TEA. Como podemos observar nos artigos que avaliaram que os genes que possuem alguma alteração no TEA podem ser regulados pelo Rest, tanto como um fator de transcrição como um fator de silenciamento de transcrição (AN *et al.*, 2018; CHENG *et al.*, 2022).

Como por exemplo relacionados com 44 dos 47 genes avaliados em filhotes machos no PND28 de ratas *Wistar* tratadas com dieta rica em gordura durante a gestação e lactação, sendo este, considerado um modelo de obesidade materna (GAWLIŃSKA *et al.*, 2021).

Sugerindo que as alterações nas expressões proteicas encontradas de GFAP, PSD95 e de OTR encontradas em nosso trabalho tenham ocorrido por conta de uma desregulação na metilação do DNA, assim como nas enzimas que metilam e desmetilam o DNA. Sugerimos também que o Rest poderia estar envolvido na expressão dessas proteínas, visto que analisando os genes avaliados no trabalho de An e colaboradores (2018), observamos que praticamente todos os genes analisados neste trabalho, assim como os genes

promotores das proteínas analisadas, com exceção do GFAP, são de alguma forma regulados pelo Rest, seja como um fator de transcrição ou por um fator de silenciamento.

Em resumo, demonstramos neste trabalho que a redução do tamanho da ninhada em G1 foi capaz de induzir excesso de ganho de peso precoce e que essa reprogramação neonatal se manteve até a idade adulta quando caracterizamos a obesidade de G1 e utilizamos essas ratas obesas para estudar suas conseqüências transgeracionais, observando que a obesidade materna foi capaz de induzir alterações comportamentais semelhantes ao TEA em machos G2 na idade pré-púbere com a redução do interesse em brincar socialmente e do reconhecimento de objetos. Observamos também que a obesidade materna induziu neuroinflamação por aumentar a quantidade de astrócito reativo e desregulou a atividade sináptica por reduzir a quantidade de PSD95, uma proteína importante para integridade dos receptores de glutamato e aparentemente reduzir a quantidade de ocitocina disponível, pois observamos uma maior quantidade de seu receptor, assim como alterou a maquinaria epigenética demonstrando uma tendência a hipermetilação global do DNA no córtex pré-frontal, enquanto no hipocampo apresentou uma hipometilação global e alterou as enzimas que metilam e desmetilam o DNA e que tais resultados podem ser mediados pela alteração do Rest, já que ele pode atuar tanto como fator transcricional como silenciador de transcrição genica de vários genes relacionados com o TEA.

8 CONCLUSÃO

A obesidade materna induzida por redução do tamanho da ninhada, induziu comportamento semelhante ao autismo, induziu uma neuroinflamação, causou prejuízos na transmissão sináptica e alterou a maquinaria epigenética em seus descendentes machos em idade pré-púbere.

REFERÊNCIAS

AHLBERG, R. *et al.* Shared familial risk factors between autism spectrum disorder and obesity - a register-based familial coaggregation cohort study. **Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines**, [s. l.], v.63, n.8, p. 890–899, 2022.

ALMEIDA, M. M. *et al.* Perinatal maternal high-fat diet induces early obesity and sex-specific alterations of the endocannabinoid system in white and brown adipose tissue of weanling rat offspring. **The British Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 118, n. 10, p. 788–803, 2017.

ALSAQATI, M. *et al.* NRSF /REST lies at the intersection between epigenetic regulation, miRNA-mediated gene control and neurodevelopmental pathways associated with Intellectual disability (ID) and schizophrenia. **Translational Psychiatry**, [s. l.], v.12, n. 1, p. 438, 2022.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. **Manual diagnóstico e estatístico de transtornos mentais: DSM-5**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed. 2014.

AN, J. Y. *et al.* Genome-wide de novo risk score implicates promoter variation in autism spectrum disorder. **Science**, New York, v. 362, n. 6420, p. eaat6576, 2018.

BACH, S. V. *et al.* Distinct roles of Bdnf I and Bdnf IV transcript variant expression in hippocampal neurons. **bioRxiv : The Preprint Server for Biology**, [s. l.], 2023.04.05.535694. 2023.

BADILLO-SUÁREZ, P. A.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.; NIEVES-MORALES, X. Impact of metabolic hormones secreted in human breast milk on nutritional programming in childhood obesity. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 171–191, 2017.

BANIK, A. *et al.* Maternal factors that induce epigenetic changes contribute to neurological disorders in offspring. **Genes**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 150, 2017.

BATISTA, T. H.; GIUSTI-PAIVA, A.; VILELA, F. C. Maternal protein malnutrition induces autism-like symptoms in rat offspring. **Nutritional Neuroscience**, [s. l.], v. 22, n. 9, p. 655–663, 2019.

BHAT, S. *et al.* Autism: cause factors, early diagnosis and therapies. **Reviews in the Neurosciences**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 841–850, 2014.

BIEL, A. *et al.* AUTS2 syndrome: molecular mechanisms and model systems. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, [s. l.], v. 15, p. 858582, 2022.

BLACK, R. E. *et al.* Maternal and child nutrition study group. maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. **Lancet**, [s. l.], v. 382, n. 9890, p. 427–451, 2013

BLIDDAL, M. *et al.* Maternal pre-pregnancy BMI and intelligence quotient (IQ) in 5-year-old children: a cohort based study. **PloS One**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. e94498, 2014.

BREDY, T. W.; SUN, Y. E.; KOBOR, M. S. How the epigenome contributes to the development of psychiatric disorders. **Developmental Psychobiology**, [s. l.], v. 52, n. 4, p. 331–342, 2010.

BUKHARI, S. H. F.; CLARK, O. E.; WILLIAMSON, L. L. Maternal high fructose diet and neonatal immune challenge alter offspring anxiety-like behavior and inflammation across the lifespan. **Life Sciences**, [s. l.], v. 197, p. 114–121, 2018.

BURD, I. *et al.* Inflammation-induced preterm birth alters neuronal morphology in the mouse fetal brain. **Journal of Neuroscience Research**, [s. l.], v. 88, n. 9, p. 1872–1881, 2010.

CARBONE, E. *et al.* Maternal immune activation induced by prenatal lipopolysaccharide exposure leads to long-lasting autistic-like social, cognitive and immune alterations in male wistar rats. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 3920, 2023.

CARLEZON, W. A. *et al.* Maternal and early postnatal immune activation produce sex-specific effects on autism-like behavior and neuroimmune function in mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 16928, 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years — Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States of America, 2016**. Atlanta, 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/69/ss/ss6904a1.htm>. Acesso em: 19 Abr. 2023.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Data & Statistics on Autism Spectrum Disorder**. Atlanta, 2022. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>. Acesso em: 08 Feb. 2023.

CHARURI, C. **Como vai a sua mente?**. São Paulo: Associação PRÓ-VIDA, 2008. p.126-127. Disponível em: https://www.provida.net/wp-content/uploads/2021/01/Como_Vai_a_Sua_Mente_Dr_Celso_Charuri_BRA_Digital_Fev_2020.pdf Acesso em: 24 maio 2023

CHENG, Y. *et al.* Transcription factor network analysis identifies REST/NRSF as an intrinsic regulator of CNS regeneration in mice. **Nature Communications**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 4418, 2022.

CLARKE, M. A.; STEFANIDIS, A.; SPENCER, S. J. Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide

throughout life. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 511–524, 2012.

COLEY, A. A.; GAO, W. J. PSD95: A synaptic protein implicated in schizophrenia or autism?. **Progress in Neuro-psychopharmacology & Biological Psychiatry**, [s. l.], v. 82, p. 187–194, 2018.

CRAWFORD, J. D. *et al.* Elevated GFAP protein in anterior cingulate cortical white matter in males with autism spectrum disorder. **Autism Research : Official Journal of the International Society for Autism Research**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 649–657, 2015.

CUSTÓDIO, C. S. *et al.* neonatal immune challenge with lipopolysaccharide triggers long-lasting sex- and age-related behavioral and immune/neurotrophic alterations in mice: relevance to autism spectrum disorders. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 55, n. 5, p. 3775-3788, 2018.

DE NOVAIS, C. O. *et al.* Maternal overweight induced by reduced litter size impairs the behavioral neurodevelopment of offspring. **Life Sciences**, [s. l.], v. 277, p. 119611, 2021.

DEARDEN, L.; OZANNE, S. E. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 39, p. 3–16, 2015.

DEBARBA, L. K. **Efeitos da programação nutricional neonatal em células da glia hipotalâmica em ratos juvenis e adultos**. 2017. 197f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2017.

DOBROVOLSKY, A. P. *et al.* Beneficial effects of xênon inhalation on behavioral changes in a valproic acid-induced model of autism in rats. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], v.17, 2019.

DUNN, G. A. *et al.* Maternal diet and obesity shape offspring central and peripheral inflammatory outcomes in juvenile non-human primates. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 102, p. 224–236, 2022.

EDLOW, A. G. Maternal obesity and neurodevelopmental and psychiatric disorders in offspring. **Prenatal Diagnosis**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 95-110, 2017.

EISSA, N. *et al.* Current enlightenment about etiology and pharmacological treatment of autism spectrum disorder. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 12, p. 304, 2018.

EKNOYAN, G. A history of obesity, or how what was good became ugly and then bad. **Advances in Chronic Kidney Disease**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 421-427, 2006.

ELOVITZ, M. A. *et al.* Intrauterine inflammation, insufficient to induce parturition, still evokes fetal and neonatal brain injury. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**. [s. l.], v. 29, n. 6, p. 663–671, 2011.

ENES-MARQUES, S.; GIUSTI-PAIVA, A. Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring. **The Journal of Physiological Sciences : JPS**, [s. l.], v. 68, n. 6, p. 789-798, 2018.

ENGIN, A. The definition and prevalence of obesity and metabolic syndrome. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Turkey, v. 960, p. 1-17, 2017.

FAGIOLINI, M.; JENSEN, C. L.; CHAMPAGNE, F. A. Epigenetic influences on brain development and plasticity. **Current Opinion in Neurobiology**, [s. l.], v.19, n. 2, p. 207- 212, 2009.

FENG, L.; LOU, J. DNA methylation analysis. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 1894, p. 181-227. 2019;

FERNANDES, M. R. *et al.* Animal models of obesity in rodents. An integrative review. **Acta Cirurgica Brasileira**, [s. l.], v. 31, n. 12, p. 840-844, 2016.

FIOROTTO, M. L. *et al.* Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. **The American Journal of Physiology**, [s. l.], v. 260, n. 6 Pt 2, p. R1104–R1113. 1991.

FLEGAL, K. M. *et al.* Trends in obesity among adults in the United States of America, 2005 to 2014. **JAMA**, [s. l.], v. 315 n. 21, p. 2284–2291. 2016.

FONTANA, C. *et al.* Early maternal care restores LINE-1 methylation and enhances neurodevelopment in preterm infants. **BMC Medicine**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 42. 2021.

GANDHI, T. *et al.* Behavioral regulation by perineuronal nets in the prefrontal cortex of the CNTNAP2 mouse model of autism spectrum disorder. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, [s. l.], v. 17, p. 1114789, 2023.

GAWLIŃSKA, K. *et al.* Alteration of the early development environment by maternal diet and the occurrence of autistic-like phenotypes in rat offspring. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 22, n. 18, p. 9662, 2021.

GOTTLIEB, M. M. Mathematical models for possible roles of oxytocin and oxytocin receptors in autism. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, [s. l.], v. 2019, p. 7308197, 2019.

HABBOU, A. *et al.* Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 143, n. 5, p. 553–56, 2013.

HACHIYA, R. *et al.* Molecular mechanism of crosstalk between immune and metabolic systems in metabolic syndrome. **Inflammation and Regeneration**, [s. l.], v. 42, n. 1, 13,2022.

HAGBERG, H.; GRESSENS, P.; MALLARD, C. Inflammation during fetal and neonatal life: implications for neurologic and neuropsychiatric disease in children and adults. **Annals of Neurology**, [s. l.], v. 71, n. 4, p. 444–457, 2012.

HARIRI, N.; THIBAUT, L. High-fat diet-induced obesity in animal models. **Nutrition Research Reviews**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 270-299, 2010.

HASEBE, K.; KENDIG, M. D.; MORRIS, M. J. Mechanisms underlying the cognitive and behavioural effects of maternal obesity. **Nutrients**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 240, 2021.

HASHEMI, E. *et al.* The number of parvalbumin-expressing interneurons is decreased in the prefrontal cortex in autism. **Cerebral Cortex**, New York, v. 27, n. 3, p. 1931–1943, 2017.

HASLAM, D. Obesity: a medical history. **Obesity reviews : an Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, Datchworth, v. 8,p. 31-36, 2007.

JASOLIYA, M. *et al.* Profiling genome-wide DNA methylation in children with autism spectrum disorder and in children with fragile x syndrome. **Genes**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 1795, 2022.

KAWASE, H. *et al.* mS-11, a mimetic of the mSin3-binding helix in NRSF, ameliorates social interaction deficits in a prenatal valproic acid-induced autism mouse model. **Pharmacology, Biochemistry, and Behavior**, [s. l.], v. 176, p. 1–5, 2019.

KENNEDY G. C. The development with age of hypothalamic restraint upon the appetite of the rat. **The Journal of Endocrinology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 9–17, 1957.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Lipopolysaccharide exposure induces maternal hypozincemia, and prenatal zinc treatment prevents autistic-like behaviors and disturbances in the striatal dopaminergic and mTOR systems of offspring. **PloS One**, [s. l.], v. 10, n. 7, e0134565, 2015.

KIRSTEN, T. B. *et al.* Pioglitazone abolishes autistic-like behaviors via the IL-6 pathway. **PloS One**, v. 13, n. 5, p. e0197060, 2018.

KOH, J. Y. *et al.* Abnormalities in the zinc-metalloprotease-BDNF axis may contribute to megalencephaly and cortical hyperconnectivity in young autism spectrum disorder patients. **Molecular Brain**, [s. l.], v. 7, p. 64, 2014.

KOMAROFF, M. for researchers on obesity: historical review of extra body weight definitions. **Journal of Obesity**, [s. l.], v. 2016, n. 6, p. 1-9, 2016.

KONG, L. *et al.* The risk of offspring psychiatric disorders in the setting of maternal obesity and diabetes. **Pediatrics**, [s. l.], v. 142, n. 3, 2018.

KRAKOWIAK, P. *et al.* Maternal metabolic conditions and risk for autism and other neurodevelopmental disorders. **Pediatrics**, [s. l.], v. 129, n. 5, p. 1121-1128, 2012.

KUYPERS, E. *et al.* White matter injury following fetal inflammatory response syndrome induced by chorioamnionitis and fetal sepsis: lessons from experimental ovine models. **Early Human Development**, [s. l.], v. 88, n. 12, p. 931–936, 2012.

LAZIC, S. E.; ESSIUX, L. Improving basic and translational science by accounting for litter-to-litter variation in animal models. **BMC Neuroscience**, [s. l.], v.14, p.37. 2013.

LEI, X. Y. *et al.* Association between parental body mass index and autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis. **European Child & Adolescent Psychiatry**, [s. l.], v. 28, n. 7, p. 933-947, 2019.

LEONHARDT, H. *et al.* A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. **Cell**, [s. l.], v. 71, n. 5, p. 865-873, 1992.

LOKE, Y. J.; HANNAN, A. J.; CRAIG, J. M. The role of epigenetic change in autism spectrum disorders. **Frontiers in Neurology**, [s. l.], v. 6, p. 107, 2015.

LORD, C. *et al.* Autism spectrum disorder. **Lancet**, London, v. 392. n. 10146, p. 508–520, 2018.

LU, T. *et al.* REST and stress resistance in ageing and Alzheimer's disease. **Nature**, [s. l.], v. 507, n. 7493, p. 448-454, 2014.

LYALL, K. *et al.* Maternal early life factors associated with hormone levels and the risk of having a child with an autism spectrum disorder in the nurses health study II. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [s. l.], v. 41, n. 5, 618-627, 2011.

MAKSOUR, S.; OOI, L.; DOTTORI, M. More than a corepressor: the role of CoREST proteins in neurodevelopment. **eNeuro**, [s. l.], v. 7, n. 2, ENEURO.0337-19.2020, 2020.

MAKUSHKIN, E. V.; MAKAROV, I. V.; PASHKOVSKIY, V. E. The prevalence of autism: genuine and imaginary. **Zhurnal Nevrologii i Psikhatrii Imeni S.S. Korsakova**, [s. l.], v. 119, n. 2, p. 80-86, 2019.

MALAEB, S.; DAMMANN, O. Fetal inflammatory response and brain injury in the preterm newborn. **Journal of Child Neurology**, [s. l.], v. 24, n. 9, p. 1119–1126, 2009.

MATIAS, S. L. *et al.* Maternal prepregnancy weight and gestational weight gain in association with autism and developmental disorders in offspring. **Obesity**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 1554–1564, 2021.

MATTA, S. M.; HILL-YARDIN, E. L.; CRACK, P. J. The influence of neuroinflammation in autism spectrum disorder. **Brain, Behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 79, p. 75–90, 2019.

MCKEE, S. E. *et al.* Perinatal high fat diet and early life methyl donor supplementation alter one carbon metabolism and DNA methylation in the brain. **Journal of Neurochemistry**, [s. l.], v. 145, n. 5, p. 362–373, 2018.

MEEKING, M. M. *et al.* Propionic acid induced behavioural effects of relevance to autism spectrum disorder evaluated in the hole board test with rats. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, [s. l.], v. 97, p. 109794, 2020.

MELANCIA, F.; TREZZA, V. Modelling fragile X syndrome in the laboratory setting: A behavioral perspective. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 350, p. 149–163, 2018.

MILLER, A. A.; SPENCER, S. J. Obesity and neuroinflammation: a pathway to cognitive impairment. **Brain, behavior, and Immunity**, [s. l.], v. 42, p. 10–21, 2014.

MISIAK, B.; RICCERI, L.; SAŚIADEK, M. M. Transposable elements and their epigenetic regulation in mental disorders: current evidence in the field. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 10, p. 580, 2019.

MODABBERNIA, A.; VELTHORST, E.; REICHENBERG, A. Environmental risk factors for autism: an evidence-based review of systematic reviews and meta-analyses. **Molecular Autism**, [s. l.], v. 8, p. 13, 2017.

MONTHÉ-DRÈZE, C. *et al.* Maternal pre-pregnancy obesity attenuates response to omega-3 fatty acids supplementation during pregnancy. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 12, p. 1908, 2018.

OLVERA HERNÁNDEZ, S. *et al.* Adult rats from undernourished dams show sex-dependent impaired expression in taste papillae and hypothalamus of genes responsible for sweet and fat detection and signalling. **Nutritional Neuroscience**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 2011–2022, 2022.

MOUTIN, E. *et al.* Restoring glutamate receptosome dynamics at synapses rescues autism-like deficits in Shank3-deficient mice. **Molecular Psychiatry**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 7596–7609, 2021.

MOZEŠ, Š.; ŠEFČÍKOVÁ, Z.; RAČEK, L. Effect of repeated fasting/refeeding on obesity development and health complications in rats arising from reduced nest. **Digestive Diseases and Sciences**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 354–361, 2015.

OHLENDORF, J. M.; ROBINSON, K.; GARNIER-VILLARREAL, M. The impact of maternal BMI, gestational weight gain, and breastfeeding on early childhood weight: Analysis of a statewide WIC dataset. **Preventive Medicine**, [s. l.], v. 118, p. 210–215, 2019.

PANAHI, Y. *et al.* Sexual dimorphism in telomere length in childhood autism. **Journal of Autism and Developmental Disorders**, [s. l.], 2022.

PANJWANI, A. A. *et al.* Maternal obesity/diabetes, plasma branched-chain amino acids, and autism spectrum disorder risk in urban low-income children: evidence of sex difference. **Autism Research : Official Journal of the**

International Society for Autism Research, [s. l.], v. 12, n. 10, p. 1562-1573, 2019.

PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. **The Journal of Nutrition**, [s. l.], v. 140, n. 3, p. 658–661, 2010.

PLAGEMANN, A. *et al.* Reduction of cholecystinin-8S-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. **Neuroscience letters**, [s. l.], v. 258, n.1, p. 13–16, 1998.

REGER, M. L.; HOVDA, D. A.; GIZA, C. C. Ontogeny of rat recognition memory measured by the novel object recognition task. **Developmental Psychobiology**, [s. l.], v. 51, n. 8, p. 672-678, 2009.

REICHOVA, A. *et al.* Abnormal neuronal morphology and altered synaptic proteins are restored by oxytocin in autism-related SHANK3 deficient model. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [s. l.], v. 518, p. 110924, 2020.

REICHETZEDER C. Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics. **European Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 75, n. 12, p. 1710–1722, 2021.

REIM, D.; SCHMEISSER, M. J. Neurotrophic factors in mouse models of autism spectrum disorder: focus on BDNF and IGF-1. **Advances in Anatomy, Embryology, and Cell Biology**, [s. l.], v. 224, p. 121–134, 2017.

RIBEIRO, A. C. A. F. *et al.* Cafeteria diet during the gestation period programs developmental and behavioral courses in the offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience : The Official Journal of the International Society For Developmental Neuroscience**, [s. l.], v. 68, p. 45–52, 2018.

RIBEIRO, A. C. A. F. *et al.* Metabolic syndrome accentuates post-traumatic stress disorder-like symptoms and glial activation. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 384, p. 112557, 2020.

ROBINSON-AGRAMONTE, M. L. A. *et al.* BDNF, proBDNF and IGF-1 serum levels in naïve and medicated subjects with autism. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 13768, 2022.

ROCKOWITZ, S.; ZHENG, D. Significant expansion of the REST/NRSF cistrome in human versus mouse embryonic stem cells: potential implications for neural development. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 43, n. 12, p. 5730–5743, 2015.

ROGERO, M. M.; CALDER, P. C. Obesity, inflammation, toll-like receptor 4 and fatty acids. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 432, 2018.

ROSEN, T. E. *et al.* Co-occurring psychiatric conditions in autism spectrum disorder. **International Review of Psychiatry**, England, v. 30, p. 40-61, 2018.

SAKAMOTO, T.; YASHIMA, J. Prefrontal cortex is necessary for long-term social recognition memory in mice. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 435, p. 114051, 2022.

SANCHES, J. R. *et al.* Polyphenol-rich extract of syzygium cumini leaf dually improves peripheral insulin sensitivity and pancreatic islet function in monosodium l-glutamate-induced obese rats. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 7, n. 48, 2016.

SANCHEZ, C. E. *et al.* Maternal pre-pregnancy obesity and child neurodevelopmental outcomes: a meta-analysis. **Obesity reviews : an Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 464-484, 2018.

SCHMIDT, I. *et al.* The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders : Journal of the International Association for the Study of Obesity**, [s. l.], v. 25, n. 8, p. 1168–1174, 2001.

SCHWARTZ, M.W. Central nervous system regulation of food intake. **Obesity**, [s. l.], v.14, Suppl 1, p.1-8, 2006.

SINGH, G.; SINGH, V.; SCHNEIDER, J. S. Post-translational histone modifications and their interaction with sex influence normal brain development and elaboration of neuropsychiatric disorders. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1865, n.8, p. 1968-1981. 2019.

SOCH, A. *et al.* Obesity after neonatal overfeeding is independent of hypothalamic microgliosis. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 31, n. 8, p. 1-12, 2019.

SPEAKMAN, J. *et al.* Animal models of obesity. **Obesity Reviews : an Official Journal of the International Association for the Study of Obesity**, [s. l.], v. 8, p. 55-61, 2007.

SRANCIKOVA, A. *et al.* Gene expression levels of DNA methyltransferase enzymes in Shank3-deficient mouse model of autism during early development. **Endocrine Regulations**, [s. l.], v. 55, n. 4, p. 234–237, 2021.

STACHOWIAK, E. K. *et al.* Maternal obesity induced by a high fat diet causes altered cellular development in fetal brains suggestive of a predisposition of offspring to neurological disorders in later life. **Metabolic Brain Disease**, [s. l.], v. 28, n. 4, p. 721–725, 2013.

STEFANIK, L. *et al.* Brain-Behavior Participant Similarity Networks Among Youth and Emerging Adults with Schizophrenia Spectrum, Autism Spectrum, or Bipolar Disorder and Matched Controls. **Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 1180-1188, 2018.

TANG, W.Y.; HO, S.M. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 173-182, 2007.

TARTAGLIONE, A. M. *et al.* Prenatal valproate in rodents as a tool to understand the neural underpinnings of social dysfunctions in autism spectrum disorder. **Neuropharmacology**, [s. l.], v. 159, p. 1-15, 2019.

TREZZA, V.; BAARENDSE, P. J.; VANDERSCHUREN, L. J. Prosocial effects of nicotine and ethanol in adolescent rats through partially dissociable neurobehavioral mechanisms. **Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 12, p. 2560–2573, 2009.

TREZZA, V.; VANDERSCHUREN, L. J. Bidirectional cannabinoid modulation of social behavior in adolescent rats. **Psychopharmacology**, [s. l.], v. 197, n. 2, p. 217–227, 2008.

TSUJI, C.; FUJISAKU, T.; TSUJI, T. Oxytocin ameliorates maternal separation-induced ultrasonic vocalisation calls in mouse pups prenatally exposed to valproic acid. **Journal of Neuroendocrinology**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. e12850, 2020.

URBONAITE, G. *et al.* The impact of maternal high-fat diet on offspring neurodevelopment. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 16, p. 909762, 2022.

VAN DEN BERGH, B. R. H.; DAHNKE, R.; MENNES, M. Prenatal stress and the developing brain: Risks for neurodevelopmental disorders. **Development and Psychopathology**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 743-762, 2018.

VARCIN, K. J.; NEWNHAM, J. P.; WHITEHOUSE, A. J. O. Maternal pre-pregnancy weight and autistic-like traits among offspring in the general population. **Autism Research : Official Journal of the International Society for Autism Research**, [s. l.], v. 12, p. 80-88, 2019.

VERONESI, V.B. **Influência da dipirona sódica sobre as respostas comportamentais em camundongos fêmeas lactantes e a repercussão nos filhotes adolescentes**. 2016. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2017.

VITOR-VIEIRA, F.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Hyperactivation of the amygdala correlates with impaired social play behavior of prepubertal male rats in a maternal immune activation model. **Behavioural Brain Research**, [s. l.], v. 414, p. 113503, 2021.

WANG, P. *et al.* Divergence and rewiring of regulatory networks for neural development between human and other species. **Neurogenesis**, Austin, v. 3, n. 1, p. e1231495, 2016.

WIDEN, E. M. *et al.* Prepregnancy obesity is associated with cognitive outcomes in boys in a low-income, multiethnic birth cohort. **BMC Pediatrics**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 507, 2019.

WILLIAMS, J. A. *et al.* Inflammation and brain structure in schizophrenia and other neuropsychiatric disorders: a mendelian randomization study. **JAMA Psychiatry**, [s. l.], v. 79, n. 5, p. 498–507, 2022.

WINDHAM, G. C. *et al.* Maternal pre-pregnancy body mass index and gestational weight gain in relation to autism spectrum disorder and other developmental disorders in offspring. **Autism Research : Official Journal of the International Society for Autism Research**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 316–327, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Autism spectrum disorders. Genebra, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/autism-spectrum-disorders>> Acesso em: 24 Oct. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity and overweight, Genebra, 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 24 Oct. 2022.

WU, C. S. *et al.* Antiobesity effect of lacticaseibacillus paracasei Im-141 on high-fat diet-induced rats through alleviation of inflammation and insulin resistance. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s. l.], eCAM, 101159, 2023.

XIAO-JIE, L. *et al.* LINE-1 in cancer: multifaceted functions and potential clinical implications. **Genetics in Medicine : Official Journal of the American College of Medical Genetics**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 431–439, 2016.

ZHAO, Y. *et al.* Brain REST/NRSF is not only a silent repressor but also an active protector. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 541-550. 2017.

ANEXOS

ANEXO A- CERTIFICADO CEUA

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Lei nº 11.154, de 29 de julho de 2005

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UNIFAL-MG

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS EPIGENÉTICOS E NEUROGÊNICOS ASSOCIADOS COM OS SINTOMAS SEMELHANTES AO AUTISMO DECORRENTES DA OBESIDADE MATERNA**, registrada com o nº **0026/2021**, sob a responsabilidade de **Alexandre Giusti Paiva**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de **pesquisa científica**, com vigência de **07/06/2021 a 07/06/2025**, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS.

Espécie/linhagem/raça	Total de animais	Total de machos	Total de fêmeas	Origem
Roedor / Wistar	48	24	24	Biotério central

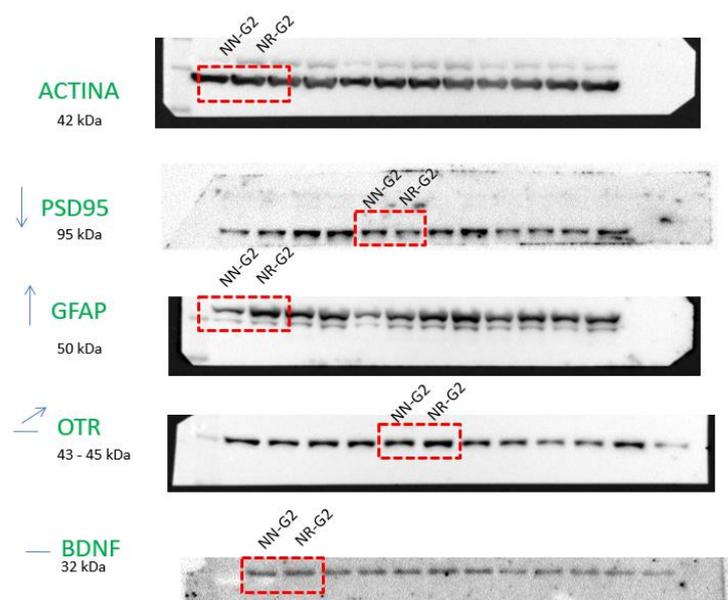
Alfenas, 24 de Fevereiro de 2023

Prof(a). Dr(a). Pollyanna Francielli de Oliveira
 Coordenador(a) do CEUA/UNIFAL - MG

Para verificar autenticidade acesse: <http://sistemas.unifal-mg.edu.br/app/ceua/autenticidadecertificado/> e digite a chave: 3d0e0827da31cbd1e1045f9b53c5d93

ANEXO B – MEMBRANAS WESTERN BLOTTING

CÓRTEX PRÉ-FRONTAL



HIPOCAMPO

