

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA**

Carolina Magrin Saullo

**Efeito do ambiente intrauterino materno inadequado
no tecido adiposo de descendentes murinos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina,
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de
Doutora em Tocoginecologia.

Orientadora : Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno

Coorientadora: Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato

Coorientador: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato

**Botucatu
2021**

Carolina Magrin Saullo

Efeito do ambiente intrauterino materno inadequado no tecido adiposo de descendentes murinos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, para obtenção do título de Doutora em Tocoginecologia.

Orientadora: Profa.Dra. Débora Cristina Damasceno

Coorientadora: Profa.Dra.Yuri Karen Sinzato

Coorientador:Prof.Dr.Gustavo Tadeu Volpato

Botucatu
2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Saullo, Carolina Magrin.

Efeito do ambiente intrauterino materno inadequado no tecido adiposo de descendentes murinos / Carolina Magrin Saullo. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina de Botucatu

Orientador: Débora Cristina Damasceno

Coorientador: Gustavo Tadeu Volpato

Coorientador: Yuri Karen Sinzato

Capes: 40101150

1. Útero. 2. Colo uterino. 3. Maternidade. 4. Dieta hiperlipídica. 5. Tecido adiposo. 6. Adipócitos. 7. Morfologia (Biologia).

Palavras-chave: Descendentes; Dieta hiperlipídica; Murinos; Revisão sistemática; Tecido adiposo.

“E aqueles que foram vistos dançando foram julgados insanos por aqueles que não podiam escutar a música”.

(Friedrich Nietzsche)

A **DEUS**, por estar presente em todos os dias da minha vida e agir da melhor maneira, sempre. Confio, entrego e aceito.

À minha família, **Silvia Marli Magrin Saullo, Antonio Aniello Saullo, Rosária Fernanda Magrin Saullo Pasini, Bruno Pasini e Thomas Saullo Pasini**, que acompanham minha jornada, sempre acreditando em mim e me apoiando. Sem vocês, eu jamais conseguiria chegar onde cheguei, pessoalmente e profissionalmente. Me espelho e me encorajo com a força e garra de vocês. Vocês me motivam todos os dias a ser alguém melhor. Amo muito.

Ao meu pai, **Antonio Aniello Saullo**, que mesmo fisicamente ausente, se faz presente em minhas orações e conversas diárias. Agradeço por ter me ensinado a ter caráter, empatia e compaixão. “Nel ricordo de tuo sorriso, seguo la mia strada “. Te amo e sinto sua falta todos os dias.

Ao meu pacotinho de amor, **Thomas Saullo Pasini**, que reconfigurou nossa família com a sua chegada. Obrigada por contagiar nossa família com sua pureza e amor.

Agradecimientos

À minha orientadora, Profa. Dra. **Débora Cristina Damasceno**, primeiramente por me acolher após 1 ano de doutorado com outro orientador. Por me ensinar a ser crítica comigo mesma e buscar meu melhor. Por compartilhar seus conhecimentos e técnicas, que foram fundamentais para meu aperfeiçoamento profissional. Meu crescimento profissional e pessoal foi notável e agradeço por me incentivar a ser forte e não desistir.

À minha coorientadora, Profa. Dra. **Yuri Karen Sinzato**, por todo apoio, ensinamentos e ajuda! Obrigada por sempre estar disposta a ajudar e compartilhar conhecimentos.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. **Gustavo Tadeu Volpato**, por todo apoio, ensinamentos e ajuda! Sem você não seria possível, obrigada.

Aos meus amigos **Carolina Abreu Miranda, Verônyca Paula, Larissa Lopes, Eduardo Kloppel, Lucas Venturini**, por estarem comigo durante essa caminhada. Agradeço a Deus por ter conhecido cada um de vocês. Vocês foram fundamentais para que eu concluísse essa fase e são muito especiais na minha vida. Obrigada pela amizade, conselhos, apoio, cafés e risadas. Amo vocês.

Às amigas que a dança me trouxe para a vida, **Loraine Rigolin, Cynthia Denadai, Laís Petrim, Maria Luiza Santana, Shayra Bonatelli, Larissa Mastranjo**. Minha vida é muito melhor por ter vocês comigo. Acredito em reencontros da vida e, para mim, nossa amizade é um reencontro. Obrigada pelo companheirismo, lealdade, fidelidade, força, apoio, confiança e cumplicidade. Vocês são anjos que Papai do céu colocou no meu caminho. Amo cada uma de vocês com todo meu coração.

À minha amiga **Loraine Gollino Rigolin**, por estar comigo em todos os momentos da minha vida, por ser minha confidente e meu porto seguro. Por segurar minha mão e me guiar quando eu não vi saída. Por literalmente me salvar sempre que precisei. Por ser forte, guerreira e me motivar a acreditar em mim. Amo você.

À minha amiga **Tainá Teixeira Ortega**, minha amiga de mais longa data, que mesmo distante, se faz presente sempre que preciso. Obrigada pela sua amizade, pelas horas de conversa *online*, por ser minha confidente de tantos anos e por não deixar nossa amizade morrer, mesmo com todas as dificuldades enfrentadas. Amo você.

Ao meu amigo **Thiago Cansian**, por ser meu irmão de coração. Obrigada pela amizade, conselhos, irmandade e apoio. Obrigada por me ouvir e sempre acolher minhas inseguranças. Obrigada por ser meu discernimento racional quando eu me perco nas minhas emoções e por me proteger sempre que eu preciso. Amo você.

Ao meu amigo **Roque Rezende Ribeiro**, que chegou na minha vida quando ela estava completamente de ponta cabeça, porém no momento que eu mais precisava, me ajudou a passar por essa fase de incertezas e inseguranças. Obrigada por toda paciência, dedicação, horas de conversa e conselhos, você é incrível.

Ao meu Terapeuta, **Danilo César Garofalo**. Com certeza sem você eu não teria conseguido concluir essa etapa da vida. Obrigada por sempre me atender em sessões extras e acolher minhas angústias. Obrigada por todo processo de auto conhecimento e transformação que você me fez passar e por me fazer entender que não temos controle sobre as atitudes das outras pessoas, porém devemos ter o controle de como essas atitudes nos atingem. Meu amadurecimento como pessoa é notável graças a você. Muito obrigada!!!

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia, **Franciane Quintanilha, Giovana Vesentini, Yuri Karen Sinzato, Vinicius Barco, Larissa Lopes, Verônyca Paula, Eduardo Kloppel e Carolina Abreu Miranda** pelos anos de convivência! Obrigada pelo companheirismo, pelos ensinamentos, pelos cafés e risadas compartilhadas.

Às pós-doutorandas **Franciane Quintanilha e Giovana Vesentini** por todo ensinamento, ajuda, paciência e trabalho! Sem vocês esse trabalho não seria possível. Obrigada por estarem comigo e me ajudarem a todos os momentos, sou muito grata!!

Aos assistentes de suporte acadêmico (ASA) da **Unidade de Pesquisa Experimental (UNIPEX)** da Faculdade de Medicina de Botucatu, especialmente aos Srs. **Danilo Chaguri e Jurandir Antônio**, pela manutenção dos biotérios, limpeza e cuidados com os animais.

Ao professor **Wellerson Rodrigo Scarano** por abrir as portas do seu laboratório e por todo ensinamento sobre técnicas de Morfologia.

À Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em especial ao **Departamento de Ginecologia e Obstetrícia** e ao **Laboratório de Pesquisa Experimental de Ginecologia e Obstetrícia (LAPGO)**, pela acolhida e concessão das dependências e aparelhos durante a realização deste trabalho.

À toda a equipe do **Escritório de Apoio à Pesquisa (EAP)** da **Faculdade de Medicina**, especialmente ao **Prof. Dr. José Eduardo Corrente**, pelo auxílio no cálculo do delineamento experimental e análises estatísticas do estudo.

Aos funcionários da Seção de **Pós-graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu**, em particular à secretária do Programa de Pós-graduação em Tocoginecologia, Sra. **Solange Sako**.

Aos professores membros do meu Exame Geral de Qualificação, pela disponibilidade, críticas e sugestões formuladas.

À **CAPES** pela concessão da bolsa, permitindo total dedicação à execução desse estudo.

Aos **animais**, que cederam suas vidas para a realização deste trabalho, contribuindo cada dia mais com a ciência.

SUMÁRIO

Capítulo 1 : Efeitos da dieta rica em gordura no tecido adiposo de descendentes murinos: Revisão Sistemática e Meta-análise	14
Resumo.....	15
Introdução.....	16
Método.....	18
Resultados.....	22
Discussão.....	26
Conclusão.....	32
Referências.....	33
Anexos	40
 Capitulo 2 Artigo Original : Exposição à hiperglicemia materna e consumo de dieta hiperlipídica após o desmame de ratas:	
Repercussões no tecido adiposo periovariano	57
Resumo.....	59
Introdução.....	60
Método.....	62
Resultados.....	67
Discussão.....	68
Conclusão.....	71
Referências.....	78
Anexos	84

Certificado CEUA	85
Prospero	86
Capítulo 1 Revisão Sistemática formato da revista Obesity : Effects of maternal high-fat diet on adipose tissue in murine offspring : A systematic review and meta-analysis	87
Submissão para revista Obesity.....	129

Capítulo 1

**Efeitos da dieta rica em gordura no tecido adiposo de descendentes
murinos: Revisão Sistemática e Meta-análise**

**Effects of maternal high-fat diet on adipose tissue in murine offspring : A
systematic review and meta-analysis**

Running title: High-fat diet and offspring repercussions

Carolina M. Saullo¹, Débora C. Damasceno¹, Yuri K. Sinzato¹, Gustavo T. Volpato²,

¹ Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Postgraduate Course on Tocogynecology, Botucatu Medcial School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.

² Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil.

Corresponding author:

Profa. Dra. Débora C Damasceno

Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia -
UNIPEX

Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito de Rubião Júnior s/s

CEP 18610.879 - Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

Phone/Fax: (+55 14) 38801631

e-mail: debora.damasceno@unesp.br

ABSTRACT

Obesity is considered a worldwide public health problem, and affects a high number of women of childbearing age. It is known that nutritional changes in the pre-gestational, gestational and lactation period result in the long-term prognosis of the offspring. Thus, this review aims at analyzing the influence of the maternal high-fat diet (HFD) on the morphology of the offspring adipocytes (visceral and subcutaneous white adipose tissue). Using the selected keywords, 4,649 articles were found in the databases. Of these, only 28 were selected to compose this systematic review and 15 were included in the meta-analysis. We concluded there is a large discrepancy in the percentage of fat that makes up the high-fat diet, ranging from 14% to 62%. In addition, it was possible to notice the lack of clarity of the information about the study design, making it difficult to replicate. In addition, the chronic consumption of a maternal hyperlipidic diet influences the development of the visceral white adipose tissue of their descendants related to adipocyte hypertrophy, regardless of the HFD or standard diet consumption. The offspring fed DHL at long-term presented hyperplasia. It was also possible to observe there is a difference regarding the adipocyte hypertrophy in the different fat regions related to the sex of the descendants.

Keywords: Hyperlipid diet, rats, pups, adipose tissue, systematic review.

RESUMO

Obesidade é considerada um problema de saúde pública mundial e atinge um alto número de mulheres em idade fértil. Sabe-se que as alterações nutricionais no período pré-gestacional, gestacional e de lactação resultam na programação da prole a longo prazo. Dessa forma, esta revisão tem como objetivo analisar a influência da dieta hiperlipídica materna (DHL) sobre a morfologia dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral e subcutâneo da prole. Foram encontrados 4.649 artigos nas bases de dados utilizando as palavras-chave selecionadas. Destes, apenas 28 foram selecionados para compor esta revisão sistemática e 15 foram incluídos na meta-análise. Concluímos que há uma grande discrepância na porcentagem de gordura que compõe a dieta rica em gordura, variando de 14% a 62%. Além disso, foi possível notar a falta de clareza nas informações sobre o delineamento dos estudos, dificultando sua replicação. Foi concluído também que o consumo crônico de uma dieta hiperlipídica materna influencia o desenvolvimento do tecido adiposo branco visceral de seus descendentes com relação à hipertrofia adipocitária, independente do consumo de DHL ou dieta padrão dos descendentes. As alterações na hiperplasia estão relacionadas com os descendentes que mantiveram o consumo de DHL. Além disso, existe um dimorfismo sexual com relação à hipertrofia de adipócitos nas diferentes regiões dos descendentes.

Palavras-chave: Dieta hiperlipídica, ratos, prole, tecido adiposo, revisão sistemática.

INTRODUÇÃO

A obesidade é considerada um problema de saúde pública mundial há anos, ¹ acometendo aproximadamente 650 milhões de adultos no mundo ². Por definição, obesidade é o aumento do tecido adiposo branco (TAB), assim como alteração na sua função, predispondo os indivíduos a apresentarem problemas metabólicos ³ além do aparecimento de outras comorbidades, como doenças cardiovasculares, musculoesqueléticas e câncer ² tendo, portanto, um grande impacto social e econômico.⁴ Pode ser diagnosticada de forma prática e fácil através do Índice de Massa Corporal (IMC), calculado pela razão entre o peso corpóreo do indivíduo e sua altura ao quadrado ⁵. De acordo com o valor obtido para diagnóstico da obesidade, há uma classificação a ser seguida, sendo que um IMC acima ou igual a 30 Kg/m² classifica o indivíduo como portador de obesidade ².

O tecido adiposo branco é caracterizado por armazenar triglicerídeos em uma única gota lipídica, com a função de proteção mecânica, armazenamento de energia e proteção térmica. É encontrado nas regiões viscerais ou subcutâneas ⁶ e possui especificidade celular em cada região, sendo mais propenso a hiperplasia na região subcutânea e a hipertrofia na região visceral. ⁷ O aumento do tecido adiposo resulta de fatores genéticos associados a fatores ambientais ⁸, como por exemplo o sedentarismo e o consumo de dieta rica em gordura, conforme verificado no padrão alimentar ocidental atual ⁹. Quando ocorre um desequilíbrio entre o consumo calórico e o gasto energético, a energia em excesso é processada e armazenada no tecido adiposo na forma de triglicerídeos por um processo chamado lipogênese ¹⁰.

O tecido adiposo branco, além de ser o principal tecido armazenador de energia, também é considerado um órgão endócrino. O acúmulo de gordura ou a expansão deste tecido se dá pelo processo de hiperplasia (aumento no número de células) ou hipertrofia (aumento na área/volume das células) dos adipócitos ¹¹. A hipertrofia adipocitária faz com que o tecido fique

hipoperfundido, criando áreas de microhipóxia e ativa vias celulares relacionadas ao aumento da expressão gênica de marcadores da inflamação com maior síntese e secreção de adipocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), interleucinas IL-1, IL-10 e IL-6 e a leptina¹². A leptina está relacionada com o metabolismo energético e regulação do consumo alimentar pelo hipotálamo ¹² e encontra-se elevada em indivíduos com obesidade e leva à resistência à leptina ¹³. Dessa forma, a resistência central à leptina, causada pelo comprometimento do transporte da leptina, da sinalização da leptina e dos circuitos neurais alvo da leptina, é considerada o principal fator de risco para a patogênese da obesidade ^{13,14} (Al-Suhaimi and Shehzad, 2013; Rosenbaum and Leibel, 2014). Além disso, os distúrbios metabólicos relacionados a obesidade variam de acordo com o gênero dos indivíduos, sendo relacionados à regulação hormonal destes, que influenciam na distribuição da gordura corporal.

14

O aumento da prevalência de obesidade afeta um alto número de mulheres em idade fértil e gestantes ². De acordo com o conceito da teoria da “Origem Desenvolvimentista de Saúde e Doença (DOHaD)”, as alterações nutricionais no período pré-gestacional, gestacional e de lactação resultam na programação dos descendentes a longo prazo ¹⁵. Isto é confirmado por estudos clínicos que mostram que a obesidade materna está relacionada com o aumento na propensão de filhos com obesidade na vida adulta ¹⁶. Assim, a obesidade materna tem influência na capacidade de armazenamento de triglicérides pelos adipócitos do tecido adiposo branco de seus descendentes, podendo levar à hipertrofia destas células ¹⁷.

Com o propósito de melhor entender melhor a relação entre o consumo de dieta hiperlipídica (DHL) materna, aparecimento da obesidade, acúmulo de tecido adiposo branco, programação nos descendentes, as vias envolvidas e tendo em vista que os depósitos de gordura em murinos e humanos são altamente análogos, em relação a morfologia e fisiologia¹⁸ e analisando o viés e

fatores éticos dos estudos clínicos, investigações em animais de laboratório são necessárias. Desta maneira, a presente revisão sistemática tem como objetivo analisar a influência da dieta hiperlipídica materna na morfologia (área, diâmetro e número) dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral e subcutâneo dos descendentes de murinos e avaliar a influência do sexo dos descendentes nos parâmetros observados.

MÉTODO

A. Estratégia de Busca

Para a realização desta revisão sistemática, a questão foi a influência da exposição materna à dieta hiperlipídica no tecido adiposo dos descendentes. Para isso, a população utilizada foram os descendentes que consumiram DHL ou dieta padrão, cuja intervenção foi o consumo de dieta hiperlipídica (DHL) pelas mães comparado ao grupo de descendentes, cujas mães consumiram dieta padrão. O desfecho avaliado foi a alteração morfológica (área e número de adipócitos) do tecido adiposo branco das regiões viscerais e subcutâneas de ambos os sexos, assim como o dimorfismo sexual entre as regiões de tecido adiposo.

O presente estudo seguiu as recomendações das diretrizes do PRISMA (*Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*)¹⁹. O protocolo desta revisão sistemática foi previamente registrado na plataforma PROSPERO (*International Prospective Register of Systematic Reviews*) sob número de protocolo CRD42020191457. A estratégia de busca foi realizada em 18 de agosto de 2020 nas bases de dados *Pubmed* (*Public/Publisher MEDLINE*), *EMBASE* (*Excerpta Medica Database*) e *Web of Science*. Os seguintes descritores da ciência da saúde (DeCS) e seus sinônimos foram combinados com os operadores booleanos “OR” e “AND”, de modo a produzir uma busca sensível e abrangente “(adipocyte OR adipose tissue OR brown adipose tissue OR BAT OR brown fat OR white adipose tissue OR WAT OR white

fat AND maternal obesity OR offspring AND high-fat diet*)*”. A estratégia de busca completa utilizada em cada base de dados encontra-se no Apêndice 1 como Material Suplementar.

Foram utilizados estudos em inglês sem restrição de ano e publicados integralmente em periódicos científicos que passaram pelo processo de *peer-review*. Os artigos foram classificados por dois pesquisadores independentes (CS e GV) e os estudos de cada base de dados foram exportadas em banco de dados do *EndNote X9*. As duplicatas foram identificadas e excluídas e posteriormente os estudos foram importados para o programa *online Rayyan*, no qual os revisores realizaram a avaliação dos estudos pelos títulos e resumos. Em seguida os artigos potencialmente elegíveis foram selecionados para análise de texto completo. Na presença de discrepâncias entre os revisores, foi realizada uma discussão entre CS e GV e, não havendo concordância, um terceiro pesquisador (DCD) foi indicado para a decisão final sobre a inclusão ou não do artigo.

B. Critérios de Elegibilidade

Animais/População

Foram incluídos estudos *in vivo* que utilizaram murinos (ratos e camundongos). Artigos que utilizaram ensaios *in vitro*, estudo em humanos, animais que não eram roedores, roedores espontaneamente obesos ou geneticamente modificados não foram incluídos.

Intervenção

Os artigos selecionados deveriam utilizar proles provenientes de um ambiente intrauterino inadequado devido ao consumo materno de dieta hiperlipídica, em um ou mais períodos associados (antes da gestação, durante gestação, durante a lactação e/ou fase pós-natal), assim como, a ingestão de DHL ou de dieta padrão pelos descendentes. Os artigos publicados com

metodologias que utilizaram dietas com alto teor de sacarose ou frutose, i.e., maiores que a dieta padrão, sendo menor teor de gordura, hipoproteicos e/ou com diminuição de quaisquer outros nutrientes foram excluídos. Pesquisas envolvendo intervenções paternas também foram excluídas.

Comparação

Os descendentes de um ambiente intrauterino desfavorável com as intervenções anteriormente citadas foram comparados com animais que vieram de um ambiente intrauterino sem alteração e que receberam apenas dieta padrão. Estudos que não apresentaram o grupo alimentado com dieta padrão foram excluídos.

Outcomes - Desfechos

Foram incluídos todos os artigos publicados com relação aos dados de morfometria (área e/ou diâmetro) de adipócitos da região visceral, constituída pelas regiões perirenal, gonadal, perigonadal, mesentérica, retroperitoneal e omental, e da região subcutânea (subescapular ou inguinal) do tecido adiposo branco de murinos. Como desfecho secundário foi avaliado o consumo de dieta em quantidade de ração e em energia consumida.

C. Extração de Dados

As informações relevantes dos artigos foram extraídas por dois pesquisadores independentes (CS e GV) e foram catalogadas em banco de dados padronizado no programa Excel (*Microsoft Office*®). Foram extraídos os seguintes dados dos artigos selecionados para esta revisão: autores; ano; composição de macronutrientes da dieta hiperlipídica; fonte de gordura da dieta hiperlipídica; composição de macronutrientes da dieta controle; animais utilizados; tempo de ingestão da dieta hiperlipídica pela mãe e pelos descendentes; tamanho amostral de todos os

grupos; quantidade de grupos do estudo; sexo dos descendentes, média e desvio-padrão (ou erro-padrão) dos desfechos de interesse avaliado (região com mais adipócitos alterados) e unidade de medida utilizada (micrômetro ou micrômetro quadrado, respectivamente, μm ou μm^2).

D. Avaliação do Risco de Viés

Os artigos selecionados para esta revisão foram avaliados quanto ao risco de viés em pares (CS e GV) por meio de uma ferramenta adaptada da *Cochrane Risk of bias tool* e específica para estudos de intervenção animal. A ferramenta SYRCLE (*Systematic Review Centre for Laboratory Animal Experimentation*)²¹ é composta por 10 itens relacionados ao viés de seleção, *performance*, detecção de atrito, divulgação e outros vieses. Para cada item de avaliação, o risco foi classificado em alto, baixo ou incerto, de acordo com as informações fornecidas pelos estudos. No caso de discrepâncias entre os pesquisadores, um terceiro pesquisador (DCD) era acionado para solucionar o conflito.

Análise estatística

Quando dois ou mais estudos reportaram informações sobre tamanho amostral, média e desvio-padrão ou erro-padrão, os mesmos foram incluídos para a meta-análise. Os resultados foram analisados de acordo com a região de coleta e tipo de dieta dos descendentes. Os desfechos analisados nas mesmas regiões de coleta como tecido adiposo mesentérico, perirenal, perigonadal, retroperitoneal e omental foram agrupados e denominados como visceral. As regiões inguinal e subescapular foram agrupadas e nomeadas como região subcutânea. Por se tratar de dados contínuos sem padronização quanto à forma de análise morfométrica dos estudos, a diferença média padronizada foi calculada usando modelo de efeitos randômicos juntamente com o intervalo de confiança. $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

O cálculo de heterogeneidade entre os estudos foi feito por I^2 , o qual é calculado pelas médias, desvios ou erros-padrão e tamanho amostral, com objetivo de determinar a heterogeneidade entre os estudos incluídos em cada desfecho da meta-análise. Os valores de corte de I^2 foram considerados como: <40% baixo, 30-60% moderado, 50-90% substancial e >75% alto ²⁰. Também para avaliar a heterogeneidade entre os estudos, foi calculado o valor de P , sendo estatisticamente significante quando $P < 0,1$. Para todos os testes estatísticos e gráficos, o *software Review Manager* (versão 5.3) foi utilizado.

RESULTADOS

Foram encontrados 4.649 artigos nas bases de dados utilizando as palavras-chave mencionadas. Destes, 939 foram retirados porque estavam em duplicata, restando 3.710 artigos para serem avaliados primeiramente pelo título. A seguir, os resumos foram analisados e 285 foram selecionados para serem lidos na íntegra e para compor a revisão sistemática. Após leitura dos artigos completos, 257 foram excluídos, sendo 113 pelo tipo de publicação, 34 devido à intervenção realizada, 1 devido à comparação dos grupos estudados, 17 em função da população analisada e 92 por não incluir os desfechos avaliados nessa revisão. Sendo assim, 28 artigos ²²⁻⁴⁹ foram incluídos nesta revisão e, destes, 15 ^{23-27,29,31,32,39,40,43,45,46,48,49} foram utilizados para a realização da meta-análise (Figura 1). A inclusão dos artigos para a meta-análise foi de acordo com a presença dos resultados apresentados em média, com desvio ou erro-padrão, seguindo a unidade de medida de micrometros ou micrometros ao quadrado, relatando também o tamanho amostral de cada grupo. Os estudos que apresentaram seus resultados de maneira descritiva, utilizando outra unidade de medida ou sem relato dos valores precisos do tamanho amostral, foram excluídos da meta-análise.

Características dos estudos incluídos

Conforme a Tabela 1, 61% dos estudos foram realizados em camundongos e 39% em ratos (Figura 2A). As principais linhagens utilizadas nos estudos foram: ratos Wistar (7 estudos)^{22,23,25,30,31,38,39}, Sprague-Dawley (3 estudos)^{40,42,43} e Long-Evans (1 estudo)⁴⁷ e camundongos C57BL/6 (6 estudos)^{28,29,32,36,45,46}, C57BL (1 estudo)³³, C57BL/6J (8 estudos)^{24,26,27,35,41,44,48,49}, C57BL/6N (2 estudos)^{34,37}. Quanto à dieta hiperlipídica, o principal componente lipídico das dietas foi a banha misturada com óleo vegetal de soja (Figura 2B), com objetivo de facilitar a manipulação da mesma. Porém, quando analisamos a distribuição dos macronutrientes da dieta hiperlipídica, ou seja, a porcentagem de carboidratos, lipídeos e proteínas que compõem a ração, houve uma ampla variedade na quantidade de gordura entre os estudos, sendo a mínima de 14%⁴⁴ e máxima de 62%⁴⁸. Foi verificada também variação quanto ao período de consumo da dieta hiperlipídica pelas mães, variando de 20 dias (as mães consumiram DHL apenas durante o período de lactação)^{25,32,44}, a 160 dias (o consumo de DHL se estendeu por 112 dias no período pré-prenhez, 20 dias no período prenhez e mais 20 dias no período de lactação) (Figura 2C)³¹. Com relação ao consumo de DHL no período pré-prenhez, houve variação de 10²⁹ a 112 dias³¹. O consumo de DHL pelos descendentes também variou de 0^{22,23,25,28,29,31-37,40,45} a 270 dias (Figura 2D)²⁷. Dos 28 estudos incluídos, 12 apresentaram a análise do tecido adiposo visceral e subcutâneo como desfecho^{22-26,32,33,42,43,45,46,49}, enquanto 14 optaram por analisar apenas a gordura visceral^{27-31,34,36,38-41,44,47,48} e 2 estudos apenas o tecido adiposo subcutâneo^{35,37}.

Análise dos desfechos principais

A área e o diâmetro dos adipócitos foram analisados. Foi encontrado aumento na área dos adipócitos do tecido adiposo visceral dos descendentes que consumiram DHL, cujas mães também consumiram DHL [SMD 2,77 (1,42 – 4,12; $P < 0,0001$; $I^2 = 73\%$)]^{24-27,39,48}. O mesmo foi encontrado nos descendentes que consumiram a dieta controle de mães que consumiram

DHL [SMD 0,75 (0,43 – 1,06; $p < 0,00001$; $I^2 = 0\%$)]^{23,25,26,29,31,39,40,45,48} quando comparados ao grupo controle, ou seja, mães que consumiram a dieta controle. Quanto ao diâmetro dos adipócitos das regiões do tecido adiposo visceral, foi encontrada um aumento apenas nos grupos cujas mães e descendentes consumiram DHL [SMD 2,52 (0,45 – 4,58; $P = 0,02$; $I^2 = 81\%$)]^{24,32,49}. Não foi encontrada diferença significativa no diâmetro dos adipócitos dos descendentes que consumiram dieta controle advindos de mães que consumiram DHL [SMD 0,66 (-2,58 – 3,90; $P=0,69$; $I^2 = 93\%$)]^{32,36}. O diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo dos descendentes que consumiram dieta controle vindos de mães que consumiram DHL [SMD 0,25 (-0,32 – 0,83; $P=0,39$; $I^2 = 2\%$)]^{22,25,45} não diferiu do diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo de descendentes que consumiram DHL de mães que também consumiram DHL [SMD 0,87 (-7,84 – 9,58; $p = 0,85$; $I^2 = 96\%$)]^{32,49} (Figura 3).

Não foi encontrada diferença na área dos adipócitos da região subcutânea de descendentes que consumiram DHL de mães que também consumiram DHL [SMD 1,42 (-0,27 – 3,12; $P= 0,10$)]²⁵ (Material Suplementar - Apêndice 2).

O número de adipócitos também foi analisado, mostrando um aumento na quantidade de adipócitos da região visceral nos descendentes que consumiram DHL vindo de mães que também consumiram DHL [SMD 1,04 (0,29-1,80; $p=0,007$; $I^2 = 14\%$)]^{25,32,41,42}. Porém, não houve diferença nos descendentes que consumiram dieta controle [SMD 0,13 (-0,35 – 0,62; $p= 0,59$; $I^2=35\%$)]^{25,31,32,41-43} vindos de mães que consumiram DHL. Na região subcutânea, não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de adipócitos, independentemente da dieta consumida pelos descendentes ser DHL [SMD 0,02 (-0,67 – 0,72; $p= 0,95$; $I^2=0\%$)]^{25,32,42} ou controle [SMD 0,12 (-0,72 – 0,96; $p =0,79$; $I^2=55\%$)] (Figura 4).^{25,32,42}

Ao analisarmos os resultados de acordo com o sexo dos descendentes, foi encontrada uma diferença significativa tanto na área [SMD 2,61 (1,47 – 6,91; $p<0.00001$; $I^2=1\%$)]^{24,27,48} quanto no diâmetro [SMD 1,36 (0,31 – 2,14; $p =0,01$; $I^2=NA$)]²⁴ dos adipócitos da região visceral de

descendentes fêmeas que consumiram DHL e vieram de mães que também consumiram essa dieta. O mesmo foi encontrado para os descendentes machos que consumiram DHL em relação à área dos adipócitos da região visceral [SMD 1,25 (0,19 – 2,32; $p = 0,02$; $I^2 = 24\%$)]^{25,39,48}, porém não foi encontrada diferença significativa no diâmetro [SMD 4,12 (-0,61 – 8,85; $p = 0,09$; $I^2 = 85\%$)]^{32,49} e número [SMD 0,68 (-0,23 – 1,58; $p = 0,14$; $I^2 = 12\%$)]^{32,42} desses adipócitos. Na região subcutânea, foi encontrada diferença significativa apenas no diâmetro [SMD 4,08 (2,37 – 5,79; $p < 0,00001$; $I^2 = 19\%$)]^{32,49} dos adipócitos dos descendentes machos que consumiram DHL vindos de mães que consumiram DHL (Tabela 2).

Os descendentes machos que consumiram dieta controle e vieram de mães que consumiram DHL apresentaram diferença significativa na área dos adipócitos da região visceral [SMD 0,59 (0,14 – 1,04; $p = 0,01$; $I^2 = 0\%$)]^{23,25,31,39,40,45,48}. Já, as descendentes fêmeas que consumiram dieta controle apresentaram diferença significativa na área dos adipócitos da região subcutânea [SMD 4,21 (1,54 – 6,89; $p = 0,002$; $I^2 = \text{NA}$)]²³. Com relação ao número de adipócitos, não houve diferença significativa em ambos os sexos de descendentes que consumiram dieta controle (Tabela 2).

Avaliando o consumo alimentar, foi encontrada uma diferença significativa no consumo de energia dos descendentes que consumiram DHL e vieram de mães que também consumiram DHL [SMD 1,61 (0,63 – 2,60; $p = 0,001$; $I^2 = 75\%$)]^{28,32,44,48,49}, o que não ocorreu nos descendentes que consumiram a dieta controle [SMD -0,13 (-0,69 – 0,44; $p = 0,66$; $I^2 = 64\%$)]^{28,32,36,44,45,48}. Também foi analisado o consumo ração consumida (em gramas) e não foram encontradas diferenças significativas, independentemente do consumo dos descendentes ser DHL [SMD 0,21 (-1,03 – 1,46; $p = 0,74$)]²⁸ ou dieta controle [SMD 0,80 (-0,18 – 1,78; $p = 0,11$; $I^2 = 72\%$)]^{28,36,47} (Figura 5).

Risco de viés

A análise do risco de viés foi alta em 16 estudos no item sequenciamento dos grupos. Em 19 estudos, quanto ao item de características básicas dos grupos experimentais, o risco de viés foi baixo. Nos itens cegamento de alocação dos animais, localização das gaiolas, cegamento dos cuidadores dos animais e randomização dos resultados, os dados fornecidos pelos estudos foram insuficientes resultando em risco de viés incerto em todos os estudos incluídos na análise, assim como o cegamento do avaliador quanto aos resultados, que teve baixo risco de viés em apenas três estudos dos 28 avaliados. No item sobre resultados incompletos, apenas sete tiveram o risco de viés baixo, os demais não forneceram informações suficientes para avaliar esse item. O relatório sobre o delineamento do estudo teve baixo risco de viés para todos os 28 estudos inclusos e, quanto aos outros vieses, 25 tiveram baixo risco de viés enquanto seis não forneceram informações suficientes para análise desse item (Figura 6 e Material Suplementar - Apêndice 3).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Principais achados

Na presente revisão, foi possível observar que existe uma disparidade na porcentagem de gordura para compor a DHL, variando de 14 a 62%, além do tempo e período de consumo dessa dieta pelas mães. Como desfecho, foi encontrado que os descendentes, independentemente se consumiram dieta hiperlipídica ou dieta controle, vindos de mães que consumiram a dieta hiperlipídica apresentaram hipertrofia da área dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral, o mesmo foi observado com o aumento do diâmetro destes adipócitos quando os descendentes também consumiram dieta hiperlipídica. Com relação à área e diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo branco subcutâneo, não houve diferença nesses parâmetros nos descendentes, independentemente do tipo de dieta que consumiram. Em relação ao número de adipócitos, foi observado um aumento na região visceral apenas dos descendentes que consumiram dieta

hiperlipídica (DHL). Com relação ao tecido adiposo branco subcutâneo, não houve hiperplasia dos adipócitos, independentemente do consumo de DHL ou dieta controle pelos descendentes (Figura 7). Quando analisados os desfechos em machos e fêmeas separadamente, foi observado que o consumo de DHL causou hipertrofia (aumento de área ou diâmetro) dos adipócitos da região visceral em ambos os sexos dos descendentes. Porém, não foi observada hiperplasia (aumento na quantidade) destes adipócitos. Para os descendentes que consumiram dieta controle, foi observada hipertrofia dos adipócitos na região visceral dos machos e na região subcutânea das fêmeas. Com relação ao consumo alimentar dos grupos avaliados, os descendentes que consumiram DHL tiveram maior ingestão calórica, mas não houve alteração na quantidade de ração consumida. Para a análise dos riscos de viés dos estudos presentes nessa revisão, em 6 itens dos 10 existentes, as informações contidas nos estudos foram insuficientes para classificação do viés. Em 11 dos 28 estudos, o risco de viés foi alto com relação a randomização dos grupos. O delineamento do estudo teve baixo risco de viés em todos os estudos desta revisão, assim como outros vieses, no qual 27 estudos apresentaram baixo risco de viés.

Implicações

Os adipócitos são células importantes para a homeostase do metabolismo devido a sua capacidade de armazenamento de energia em forma de triglicerídeos. Além disso, possui uma relação positiva com a resistência à insulina e com o estado inflamatório ⁵⁰. Assim, alterações no tecido adiposo levam a diversos efeitos patológicos, como altos níveis de ácidos graxos livres circulantes, induzindo um quadro inflamatório crônico pela síntese e secreção de adipocinas pró-inflamatórias, dentre elas a leptina, que desregula a homeostase metabólica ⁵¹. A hiperleptinemia, quando diagnosticada no desmame, está associada com aumento nas concentrações séricas de leptina, sugerindo uma resistência à leptina ⁵². No tecido adiposo

branco, o sistema endocanabinóide (SECB) é um dos ativadores do processo de lipogênese, pelo estímulo da lipase-lipoproteica ⁵³. Como resposta ao aumento desse processo, ocorre a hipertrofia adipocitária, que por sua vez ocasiona maior síntese e secreção de leptina, gerando um quadro de hiperleptinemia. Dessa maneira, alterações no SECB vem sendo associadas com o desenvolvimento da obesidade e resistência a leptina ⁵⁴.

O consumo de DHL materna resulta em diferentes regulações nos componentes do sistema endocanabinoide (receptores e ligantes) no tecido adiposo branco em descendentes machos e fêmeas após o desmame ²². Estes apresentam aumento na expressão de CB1 (receptor de canabinóide 1) nos adipócitos do tecido adiposo branco visceral. O aumento na expressão de CB1 está relacionada à redução do fator de transcrição do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR-gama) no tecido, um dos responsáveis pelo processo de diferenciação celular do adipócito, pelo processo de adipogênese ⁵⁵. Tendo em vista que o organismo precisa armazenar triglicérides, o processo de hipertrofia é estimulado até mesmo no tecido adiposo subcutâneo ²². Além disso, o consumo de DHL materna estimula nos descendentes, as enzimas ativadoras do processo de lipogênese, como a lipase lipoproteica, induzindo o processo de hipertrofia adipocitária, além de reduzir os fatores ativadores da adipogênese, reduzindo o processo de diferenciação celular dos adipócitos, inibindo dessa maneira a hiperplasia adipocitária⁵³.

Estudos em animais mostram que o consumo materno de DHL nos períodos pré-prenhez, prenhez e lactação resulta em diferentes regulações do SECB no tecido adiposo dos descendentes ²², além de afetar negativamente o desenvolvimento fetal, gerando consequências a longo prazo na saúde. Sabe-se que, durante o período perinatal, o desbalanço nutricional materno é um importante fator para a programação do desenvolvimento de obesidade e outras comorbidades dos descendentes na vida adulta ⁵⁶. Isso ocorre devido à existência de uma janela

crítica de programação fetal do período gestacional ⁵⁷, ou seja, diferentes momentos de exposição a um ambiente obesogênico pode acarretar em alterações no fenótipo dos descendentes por modificações em determinadas células ou tecidos, dependendo dos órgãos que estão em desenvolvimento no momento da intervenção dietética ⁵⁸. Os insultos maternos durante o desenvolvimento do tecido adiposo determinarão a janela de vulnerabilidade a possíveis futuras agressões ambientais. Em roedores, a adipogênese (transformação de pré-adipócitos em adipócitos maduros) é ativa durante o período perinatal, principalmente durante a última semana de prenhez e é acelerada desde o início da vida pós-natal até o desmame ⁵⁹. Em humanos, esse processo ocorre antes do nascimento ⁶⁰.

Tendo em vista esse período de diferenciação do tecido adiposo, o consumo materno de DHL durante essa janela crítica do desenvolvimento, pode induzir o ganho de peso e a adiposidade dos seus descendentes ³² e as alterações da nutrição materna e dos filhotes durante a lactação é suficiente para influenciar a adiposidade desses na vida adulta ⁶¹. O período de lactação é altamente sensível para o desenvolvimento do tecido adiposo branco. Nos humanos, a proporção de tecido dobra de 10% (no nascimento) para 20% (em torno de seis semanas de vida) ⁶². Essa expansão é ainda mais marcante em roedores, os quais possuem depósitos insignificantes de gordura ao nascimento. Além do tempo de desenvolvimento, as características do tipo de tecido adiposo são de importante relevância, tendo em vista sua diferencial susceptibilidade às doenças metabólicas. Os adipócitos subcutâneos estão associados a efeitos metabólicos protetores ¹⁸, já os viscerais, que em roedores estão contidos nos depósitos gonadal, perirenal, retroperitoneal, mesentérico, omental e pericárdico, são comumente associados a distúrbios metabólicos, como o *Diabetes mellitus* Tipo 2 ⁶³. Essa diferença funcional pode ser explicada devido à capacidade distinta de adipogênese e replicação de pré-adipócitos ⁷, tendo em vista que adipócitos maduros porém não hipertrofiados, sintetizam e secretam adipocinas anti-inflamatórias, enquanto que adipócitos hipertrofiados,

são responsáveis por secretar grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias.

Em condições fisiológicas, é necessário que exista um equilíbrio entre hiperplasia e hipertrofia adipocitária, visto que o adipócito maduro sintetiza e secreta adipocinas anti-inflamatórias, mas isso não ocorre se estiver hipertrofiado ⁶⁴. A DHL ingerida pela mãe influencia a hiperplasia adipocitária dos descendentes e estimula a cascata de sinalização da lipogênese, elevando assim a hipertrofia dos adipócitos ⁶⁵. No caso da obesidade hipertrófica, existe uma infiltração de macrófagos, que prejudica o processo de adipogênese ⁶⁶.

Tendo em vista os resultados dessa revisão, os descendentes de mães que consumiram DHL apresentaram hipertrofia dos adipócitos do tecido adiposo branco visceral, tornando-os mais susceptíveis ao desenvolvimento de comorbidades. A diferença da hipertrofia dos adipócitos nas diferentes regiões de tecido adiposo com relação ao sexo dos descendentes pode ser explicada pela presença de receptores de estrogênio alfa e beta nas células do tecido adiposo das descendentes fêmeas, por possuírem efeitos metabólicos como anti-lipogênese e redução do peso corporal ⁶⁷. O consumo de DHL materna reduz a presença desses receptores no tecido adiposo visceral e subcutâneo de descendentes fêmeas, tendo como consequência o estímulo à lipogênese e ganho de peso.

A fisiologia do tecido adiposo da região subcutânea é mais propensa ao desenvolvimento de hiperplasia, devido a prevalência de fatores relacionados com o processo de adipogênese, enquanto o tecido adiposo da região visceral tem maior propensão ao desenvolvimento de hipertrofia das células adiposas⁶⁸. Isto explica os resultados da presente revisão quanto à expansão de área dos adipócitos das regiões viscerais, mas não nas subcutâneas de descendentes de mães que consumiram DHL. Assim, o tecido adiposo não é um órgão homogêneo, sendo composto por subtipos celulares efetivamente distintos ¹⁸. Os mecanismos essenciais,

combinados com a variação local na composição celular, provavelmente são responsáveis pelas diferenças regionais no tamanho e função do tecido adiposo.

Pontos fortes e limitações

Um dos fatores causais da hipertrofia adipocitária visceral é o consumo crônico de DHL, porém foi verificado nessa revisão que não existe um padrão para uma dieta ser considerada hiperlipídica, pois houve uma alta variação, entre 14 e 62%, na quantidade de gordura presente na composição da ração hiperlipídica, sendo este considerado um fator limitante. Para humanos, o valor de consumo máximo de macronutrientes varia de acordo com a diretriz de recomendação de consumo máximo de lipídeos por dia. O valor máximo de consumo é de 30% da ingestão calórica diária total segundo a *Recommended Dietary Allowances* ⁶⁹. Porém, não existe uma padronização sobre a porcentagem de consumo de gordura para roedores para que se possa padronizar uma dieta hiperlipídica, sendo interessante estabelecer um padrão para ser seguido por estudos com esse tipo de intervenção alimentar, objetivando mimetizar a quantidade de gordura consumida nas dietas ocidentais.

Ao analisarmos os riscos de viés, foi possível observar que não há informações suficientes sobre a condução dos experimentos, cegamento dos pesquisadores, como foi realizada a randomização dos grupos estudados e outros detalhes que interferem na replicação do estudo e na fidedignidade dos resultados. Outro ponto importante é a maneira como os resultados são expostos, com diferentes unidades de medidas, sendo uma desvantagem para a realização da meta-análise.

Portanto, podemos concluir que o consumo crônico de DHL pelas mães influencia no desenvolvimento do tecido adiposo branco visceral de seus descendentes com relação a sua morfologia, quanto a área, diâmetro e número dos adipócitos, quando os descendentes mantêm

o consumo de DHL na vida pós-natal. Porém, com o consumo de dieta padrão pelos descendentes, foi possível observar uma diferença entre a hipertrofia adipocitária com relação à região do tecido adiposo e o sexo dos descendentes, ocorrendo hipertrofia na região visceral dos machos e na região subcutânea das fêmeas.

Considerando o atual cenário mundial, no qual o consumo de dieta ocidental, rica em gordura e calorias está elevado, é de fundamental importância transpor da pesquisa experimental em animais para a prática clínica, a influência da transgeracionalidade da obesidade na fisiologia adipocitária dos descendentes, objetivando evitar futuras comorbidades relacionadas ao excesso de tecido adiposo nestes indivíduos, com a melhora na qualidade de vida, principalmente relacionada a nutrição.

CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram que não há conflitos de interesse com relação ao artigo intitulado “*Effects of maternal high fat diet on adipose tissue in rodents: Systematic review and Meta-analysis*”, submetido para apreciação à revista *Obesity*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os alunos da equipe de pesquisa do Laboratório Experimental em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutrition Reviews*. 2012;70(1):3-21. doi:10.1111/j.1753-4887.2011.00456.x
2. Obesity and overweight. Accessed January 7, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
3. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *Journal of Clinical Investigation*. 2011;121(6):2094-2101. doi:10.1172/JCI45887
4. Meera Shekar BP. *Challenge, Obesity: Health and Economic Consequences of an Impending Global Human Development Perspectives*. World Bank Publications; 2020.
5. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. *World Health Organization technical report series*. 2000;894:i-xii, 1-253.
6. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 2000;11(8):327-332. doi:10.1016/S1043-2760(00)00301-5
7. Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(17):6676-6681. doi:10.1073/pnas.0601752103
8. Bouchard C. Childhood obesity: Are genetic differences involved? In: *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 89. Am J Clin Nutr; 2009. doi:10.3945/ajcn.2009.27113C
9. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *The Lancet*. 2011;378(9793):804-814. doi:10.1016/S0140-6736(11)60813-1
10. Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nature Metabolism*. 2019;1(2):189-200. doi:10.1038/s42255-018-0021-8
11. Björntorp P, Sjöström L. Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity. *Metabolism*. 1971;20(7):703-713. doi:10.1016/0026-0495(71)90084-9

12. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. *Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(9):2992-3002. doi:10.1172/JCI34260
13. Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: The missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *European Journal of Medical Research*. 2013;18(1). doi:10.1186/2047-783X-18-12
14. Rosenbaum M, Leibel RL. Role of leptin in energy homeostasis in humans. *Journal of Endocrinology*. 2014;223(1):T83-T96. doi:10.1530/JOE-14-0358
15. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *American Journal of Human Biology*. 2007;19(1):1-19. doi:10.1002/ajhb.20590
16. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health - PubMed. Accessed January 7, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19173021/>
17. Lukaszewski MA, Eberlé D, Vieau D, Breton C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2013;305(10). doi:10.1152/ajpendo.00231.2013
18. Tchkonina T, Thomou T, Zhu Y, et al. Mechanisms and Metabolic Implications of Regional Differences among Fat Depots. *Cell Metabolism*. 2013;17(5):644-656. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.008
19. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ (Clinical research ed)*. 2009;339. doi:10.1136/bmj.b2700
20. Higgins JPT TJ, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. 2nd Edition. Chichester (UK): John Wiley & Sons. 2019.

21. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Medical Research Methodology*. 2014;14(1):43. doi:10.1186/1471-2288-14-43
22. Almeida MM, Dias-Rocha CP, Souza AS, 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. *Br J Nutr*. 2017;118(10):788-803.
23. de Almeida MM, Dias-Rocha CP, Reis-Gomes CF, et al. Maternal high-fat diet up-regulates type-1 cannabinoid receptor with estrogen signaling changes in a sex- and depot- specific manner in white adipose tissue of adult rat offspring. *Eur J Nutr*. Published online 2020.
24. Bibi S, Kang Y, Du M, Zhu M. susceptibility to DSS-induced colitis in mice. 2019;25(5):901-908.
25. Butruille L, Marousez L, Pourpe C, et al. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. *Int J Obes*. 2019;43(12):2381-2393.
26. Chang E, Hafner H, Varghese M, et al. Programming effects of maternal and gestational obesity on offspring metabolism and metabolic inflammation. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-15.
27. Ding Y, Li J, Liu S, et al. DNA hypomethylation of inflammation-associated genes in adipose tissue of female mice after multigenerational high fat diet feeding. *Int J Obes*. 2014;38(2):198-204.
28. Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-De-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *Eur J Nutr*. 2013;52(2):759-769.
29. Jiao F, Yan X, Yu Y, et al. Protective effects of maternal methyl donor supplementation on adult offspring of high fat diet-fed dams. *J Nutr Biochem*. 2016;34:42-51.
30. Kruse M, Seki Y, Vuguin PM, et al. High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. *Endocrinology*. 2013;154(10):3565-3576.
31. Lecoutre S, Deracinois B, Laborie C, et al. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J Endocrinol*. 2016;230(1):39-53.
32. Liang X, Yang Q, Fu X, et al. Maternal obesity epigenetically alters visceral fat progenitor cell

properties in male offspring mice. *J Physiol*. 2016;594(15):4453-4466.

33. Liang X, Yang Q, Zhang L, et al. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. *Sci Rep*. 2016;6(May):1-12.
34. Litzenburger T, Huber EK, Dinger K, et al. Maternal high-fat diet induces long-term obesity with sex-dependent metabolic programming of adipocyte differentiation, hypertrophy and dysfunction in the offspring. *Clin Sci*. 2020;134(7):921-939.
35. Liu F, Zhang G, Sheng X, et al. Effects of hereditary moderate high fat diet on metabolic performance and physical endurance capacity in C57BL/6 offspring. *Mol Med Rep*. 2018;17(3):4672-4680.
36. Magliano DC, Bargut TCL, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors-Alpha and Gamma Are Targets to Treat Offspring from Maternal Diet-Induced Obesity in Mice. *PLoS One*. 2013;8(5).
37. Murabayashi N, Sugiyama T, Zhang L, et al. Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2013;169(1):39-44.
38. Parente LB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. *Clin Nutr*. 2008;27(4):623-634.
39. dos Santos LS, de Matos RJB, Cordeiro G dos S, et al. Perinatal and post-weaning exposure to an obesogenic diet promotes greater expression of nuclear factor- κ B and tumor necrosis factor- α in white adipose tissue and hypothalamus of adult rats. *Nutr Neurosci*. 2020;0(0):1-9.
40. Segovia SA, Vickers MH, Harrison CJ, Patel R, Gray C, Reynolds CM. Maternal High-Fat and High-Salt Diets Have Differential Programming Effects on Metabolism in Adult Male Rat Offspring. *Front Nutr*. 2018;5(March):1-13.
41. Sellayah D, Thomas H, Lanham SA, Cagampang FR. Maternal obesity during pregnancy and lactation influences offspring obesogenic adipogenesis but not developmental adipogenesis in mice. *Nutrients*. 2019;11(3).
42. Šnajder D, Perić Kačarević Ž, Grgić A, et al. Effect of different combination of maternal and postnatal diet on adipose tissue morphology in male rat offspring. *J Matern Neonatal Med*. 2019;32(11):1838-1846.
43. Tsai TA, Tsai CK, Huang LT, et al. Maternal resveratrol treatment re-programs and maternal high-fat diet-induced retroperitoneal adiposity in male offspring. *Int J Environ Res Public*

Health. 2020;17(8).

44. Tsuduki T, Yamamoto K, Shuang E, Hatakeyama Y, Sakamoto Y. High dietary fat intake during lactation promotes the development of social stress-induced obesity in the offspring of mice. *Nutrients*. 2015;7(7):5916-5932.
45. Umekawa T, Sugiyama T, Du Q, et al. A maternal mouse diet with moderately high-fat levels does not lead to maternal obesity but causes mesenteric adipose tissue dysfunction in male offspring. *J Nutr Biochem*. 2015;26(3):259-266.
46. Volpato AM, Schultz A, Magalhães-Da-Costa E, Correia MLDG, Águila MB, Mandarim-De-Lacerda CA. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. *Neuroendocrinology*. 2012;96(4):272-284.
47. White CL, Purpera MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(5).
48. Yokomizo H, Inoguchi T, Sonoda N, et al. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic β -cell function in adult offspring with sex differences in mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2014;306(10):1163-1175.
49. Zou T, Chen D, Yang Q, et al. Resveratrol supplementation of high-fat diet-fed pregnant mice promotes brown and beige adipocyte development and prevents obesity in male offspring. *J Physiol*. 2017;595(5):1547-1562.
50. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(1):175-184. doi:10.1172/JCI29881
51. Spitzer JA, Kovach AG, Rosell S, Sandor P, Spitzer JJ, Storck R. Influence of endotoxin on adipose tissue metabolism. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 1972;33(0):337-344. doi:10.1007/978-1-4684-3228-2_33
52. MT R-L, R A, J D, et al. Correction: Exposure to a highly caloric palatable diet during the perinatal period affects the expression of the endogenous cannabinoid system in the brain, liver and adipose tissue of adult rat offspring (PLoS ONE (2016) 11:11 (e0165432) DOI: 10.1371/journal.pone.0165432). *PLoS ONE*. 2017;12(3). doi:10.1371/journal.pone.0173653
53. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the

- etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metabolism*. 2013;17(4):475-490. doi:10.1016/j.cmet.2013.03.001
54. Iannotti FA, Piscitelli F, Martella A, et al. Analysis of the “endocannabinoidome” in peripheral tissues of obese Zucker rats. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 2013;89(2-3):127-135. doi:10.1016/j.plefa.2013.06.002
 55. Pagano C, Pilon C, Calcagno A, et al. The endogenous cannabinoid system stimulates glucose uptake in human fat cells via phosphatidylinositol 3-kinase and calcium-dependent mechanisms. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2007;92(12):4810-4819. doi:10.1210/jc.2007-0768
 56. Lillycrop KA, Burdge GC. Maternal diet as a modifier of offspring epigenetics. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 2015;6(2):88-95. doi:10.1017/S2040174415000124
 57. Ellsworth L, Harman E, Padmanabhan V, Gregg B. Lactational programming of glucose homeostasis: A window of opportunity. *Reproduction*. 2018;156(2):R23-R42. doi:10.1530/REP-17-0780
 58. Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM. The developmental origins of adipose tissue. *Development (Cambridge)*. 2013;140(19):3939-3949. doi:10.1242/dev.080549
 59. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annual Review of Biochemistry*. 2012;81:715-736. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718
 60. Muhlhausler B, Smith SR. Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2009;20(2):51-57. doi:10.1016/j.tem.2008.10.006
 61. Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro K. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes*. 2012;61(11):2833-2841. doi:10.2337/db11-0957
 62. Carberry AE, Colditz PB, Lingwood BE. Body composition from birth to 4.5 months in infants born to non-obese women. *Pediatric Research*. 2010;68(1):84-88.

doi:10.1203/PDR.0b013e3181df5421

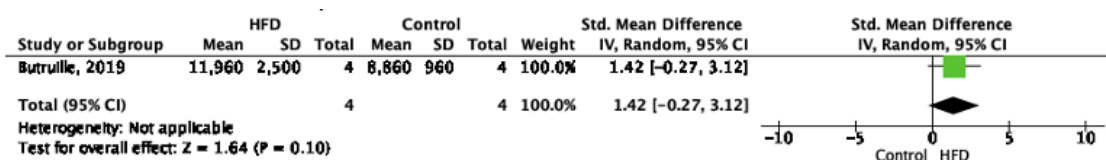
63. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell*. 2014;156(1-2):20-44. doi:10.1016/j.cell.2013.12.012
64. de Queiroz JCF, Alonso-Vale MIC, Curi R, Lima FB. Control of adipogenesis by fatty acids. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*. 2009;53(5):582-594. doi:10.1590/s0004-27302009000500011
65. Yee JK, Lee WNP, Ross MG, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulation and lipogenic response in adipocytes of small-for-gestational age offspring. *Nutrition and Metabolism*. 2012;9(1). doi:10.1186/1743-7075-9-62
66. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiology and Behavior*. 2008;94(2):206-218. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.010
67. Blüher M. Importance of estrogen receptors in adipose tissue function. *Molecular Metabolism*. 2013;2(3):130-132. doi:10.1016/j.molmet.2013.07.001
68. Tchkonina T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, et al. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2005;288(1 51-1). doi:10.1152/ajpendo.00265.2004
69. *Diet and Health*. National Academies Press; 1989. doi:10.17226/1222

Material Suplementar

Apêndice 1. Estratégia de busca Pubmed em 18/08/2020

(rat OR rats OR rattus OR (rattus norvegicus) OR mice* OR mouse OR rodent* OR Mus OR (mus musculus) OR (mice, house) OR (house mice) OR (mouse, house) OR (house mouse) OR (mus domesticus) OR (mus musculus domesticus) OR (domesticus, mus musculus) OR (mice, laboratory) OR (laboratory mice) OR (mouse, laboratory) OR (laboratory mouse) OR (mouse, swiss) OR (swiss mouse) OR (swiss mice) OR (mice, swiss)) AND ((high fat) OR (high-fat) OR (high-fat diet*) OR (high fat diet*) OR (dietary fat) OR (high-fat feed*) OR (high fat feed*) OR (high-fat fed) OR (high fat fed) OR (lard-fed, fat-rich) OR (diet-induced obesity) OR (lipid diet)) AND ((maternal obesity) OR maternal OR mother OR dam OR dams OR perinatal OR prenatal* OR pre-natal* OR gestat* OR prepregn* OR pre-pregn* OR pregestat* OR pre-gestat* OR pregravid* OR pre-gravid* OR gravid* OR mating OR preconcept* OR preconcept* OR conception OR fetal* OR fetus OR pups OR pregnan* OR (expos* in utero) OR (intrauterine expos*) OR (intra-uterine expos*) OR (prenatal exposure delayed effects) OR offspring* OR progeny OR lactation OR litter) AND (leptin OR adipocyte OR adipokines OR adipogenesis OR adiponectin OR TNF α OR TNFalpha OR (tumor necrosis factor-alpha) OR IL-6 OR (interleukin 6) OR interleukin OR (adipose tissue) OR (Brown adipose tissue) OR BAT OR (brown fat) OR (white adipose tissue) OR WAT OR (white fat))

Apêndice 2. *Forest plot* da meta-análise da área dos adipócitos do tecido adiposo branco na região subcutânea de descendentes que consumiram DHL vindos de mães que consumiram DHL



Material Suplementar

Apêndice 3. Delineamento do risco de viés

	Sequence generation (selection bias)	Baseline characteristics (selection bias)	Allocation concealment (selection bias)	Random housing (performance bias)	Blinding caregivers and/or investigators (performance bias)	Random outcome assessment (detection bias)	Blinding of outcome assessment (detection bias)	Incomplete outcome data (attrition bias)	Selective reporting (reporting bias)	Other bias
Almeida, 2017	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Almeida, 2020	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Bibi, 2017	?	?	?	?	?	?	?	+	+	+
Butrulle, 2019	+	?	?	?	?	?	+	?	+	+
Chang, 2019	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Ding, 2013	+	?	?	?	?	?	?	+	+	+
Gregorio, 2013	+	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Jiao, 2016	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Kruse, 2013	+	+	?	?	?	?	+	?	+	+
Lecoutre, 2016	+	+	?	?	?	?	?	+	+	+
Liang, 2016a	+	+	?	?	?	?	?	+	+	+
Liang, 2016b	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Litzenburger, 2020	+	?	?	?	?	?	?	?	+	+
Liu, 2018	?	+	?	?	?	?	?	?	+	?
Magliano, 2013	?	+	?	?	?	?	?	+	+	+
Murabayashi, 2013	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Parente, 2008	+	?	?	?	?	?	?	?	+	+
Santos, 2020	+	?	?	?	?	?	?	+	+	+
Segovia, 2018	+	?	?	?	?	?	+	+	+	+
Sellayah, 2019	+	?	?	?	?	?	?	?	+	+
Snajder, 2019	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Tsal, 2020	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Tsudukl, 2013	+	+	?	?	?	?	?	?	+	?
Umekawa, 2015	+	+	?	?	?	?	?	?	+	?
Volpato, 2012	+	?	?	?	?	?	?	?	+	?
White, 2009	+	+	?	?	?	?	?	?	+	?
Yokomizo, 2014	+	+	?	?	?	?	?	?	+	+
Zou, 2017	?	+	?	?	?	?	?	?	+	+

Tabela 1. Características dos estudos incluídos na revisão sistemática.

Autor/ano (No. Referência)	Animal	Animal número/grupo	Fonte lipídica	Composição DHL	Composição Dieta Padrão	Tempo de consumo da DHL (Mães) em dias	Tempos de consumo da DHL (descendentes) em dias	Sexo	Desfecho Avaliado
Almeida MM, 2017 22	Wistar	Controle = 15 DHL = 15	Banha + óleo de soja	17,3% PTN 26,6% LP 54,1% CHO	22,6% PTN 9,4% LP 68% CHO	56 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0	M + F	M + F Subcutânea (↑ diâmetro) M + F + Visceral (↑ diâmetro)
Almeida MM, 2020 23	Wistar	Controle = 15 DHL = 15	Banha + óleo de soja	28,6% LP	9% LP	56 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0	M + F	Machos Subcutânea (↓ área) + Visceral (= área) Fêmeas Subcutânea (↑ área) + Visceral (↑ área)
Bibi S, 2019 24	C57BL/6 J	Controle = 9 DHL = 9	NR	60% LP	10% LP	Prenhez + Lactação	91	F	Subcutânea + Visceral (↑ diâmetro)
Butruille L, 2019 25	Wistar	12 dias de vida (Controle e DHL) = 6 6 meses de vida (Controle e DHL) = 4	Banha + óleo de soja	20% PTN 60% LP 20% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	Lactação	0 90	M + F M	12 dias de vida Subcutânea (↑ área) (= número) + Visceral (↑ área) (= número)

									6 meses Subcutânea (↑ área) (= número) + Visceral (↑ área) (↑ número)
Chang E, 2019 26	C57BL/6 J	Controle = 8 DHL = 16	Banha + óleo de soja	20% PTN 60% LP 20% CHO	28,5% PTN 13% LP 57,9% CHO	42 Pré- prenhez + Prenhez	84	M + F	Subcutâneo (= área) + Visceral (↑ área)
Ding Y, 2014 27	C57BL/6 J	Controle = 4 DHL = 4	Banha + óleo de soja	20% PTN 60% LP 20% CHO	NR	30 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	270	F	Visceral (↑ área)
Gregorio BM, 2013 28	C57BL/6	Controle = 5 DHL = 5	NR	19% PTN 49% LP 32% CHO	19% PTN 17% LP 64% CHO	Prenhez Lactação Prenhez + Lactação	0	M	Visceral (↑ diâmetro)
Jiao F, 2016 29	C57BL/6	Controle = 4 DHL = 5	NR	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	10 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0	M + F	Visceral (↑ área)
Kruse M, 2013 30	Wistar	Controle = 3 DHL = 3	Banha	20% PTN 35,5% PL 36,3% CHO	20% PTN 9% LP 53% CHO	15 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	133	M	Visceral (↑ área)
Lecoutre S, 2016 31	Wistar	Controle = 6 DHL = 6	Banha + óleo de soja	20% PTN 60% LP 20% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	112 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0	M + F	Machos Visceral (↑ área) (↑ número) Fêmeas Visceral (= área)

									(= número)
Liang X, 2016 32	C57BL/6	Controle = 6 DHL = 6	Banha + óleo de soja	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	56 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0 90	M	Subcutânea (↑ área) (=número) + Visceral (↑ área) (=número)
Liang X, 2016 33	C57/BL	Controle = 8 DHL = 6	Banha + óleo de soja	20% PTN 60% LP 20%CHO	10% LP	Lactação	0	M	Subcutânea (↑ área) + Visceral (↑ área)
Litzenburger T, 2020 52	C57BL/6 N	Controle = 4 DHL = 4	Ác. linolênic o	19% PTN 34% LP 47% CHO	27% PTN 16% LP 57% CHO	56 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0	M + F	M + F Visceral (↑ diâmetro)
Liu F, 2018 35	C57BL/6 J	Controle = 8 DHL = 8	NR	26% LP	9% LP	98 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0	NR	Subcutânea (↑ área)
Magliano CD, 2013 36	C57BL/6	Controle = 10 DHL = 10	Banha + óleo de soja	19% PTN 49% LP 32% CHO	14% PTN 10% LP 75% CHO	56 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	0	M	Visceral (↑ diâmetro)
Murabayashi N, 2013 37	C57BL/6 N	NR	NR	20% PTN 60%LP 20%CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	30 Pré- prenhez	0	M	Subcutânea (↑ diâmetro)
Parente LB, 2008 38	Wistar	NR	Óleo de soja	20% PTN 49% LP 20% CHO	20% PTN 7% LP 62% CHO	Prenhez + ½ Lactação	180	M	Visceral (↑ área)
Santos LS, 2020 39	Wistar	Controle= 12 DHL/Controle=11 DHL/DHL= 12	NR	17% PTN 23% LP 46% CHO	22% PTN 4% LP 57% CHO	Prenhez + Lactação	120	M	Visceral (↑ área)
Segovia SA, 2018	Sprague- Dawley	Controle= 7	NR	45% LP	10% LP	21 Pré- prenhez +	0	M	Visceral (= área)

40		DHL = 7				Prenhez + Lactação			
Sellayah D, 2019 41	C57BL/6 J	Controle = 5 DHL = 5	NR	20% PTN 45% LP 35% CHO	17,5% PTN 7,4% LP 75% CHO	42 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	182	M + F	Visceral (↑ área) (↑ número)
Snajder D, 2019 42	Sprague- Dawley	Controle = 6 DHL = 6	Óleo de palma	27,2% PTN 28% LP 30% CHO	21,7% PTN 0,4% LP 66,5% CHO	42 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	133	M	Subcutânea (↑ área) (= número) + Visceral (↑ área) (= número)
Tsai T, 2020 43	Sprague- Dawley	Controle = 14 DHL = 13	Óleo de soja + óleo de coco	17% PTN 58% LP 25% CHO	NR	56 Pré- prenhez +Prenhez + Lactação	56	M	Subcutânea (= área) + Visceral (= área)
Tsuduki T, 2015 44	C57BL/6 J	Controle = 12 DHL = 12	Banha	24% PTN 14% LP 62% CHO	25% PTN 5% LP 70% CHO	Lactação	30	M	Visceral (↑ área)
Umekawa T, 2015 45	C57BL/6	Controle = 5 DHL = 6	Banha + óleo de soja	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	42 Pré- prenhez + Prenhez	0	M	Subcutânea (= área) + Visceral (↑ área)
Volpato AM, 2012 46	C57BL/6	Controle = 6 DHL = 6	Banha	19% PTN 49% LP 32% CHO	19% PTN 17% LP 64% CHO	Prenhez + Lactação	63	M	Subcutânea + Visceral (↑ área)
White CL, 2009 47	Long- evans	Controle = 5 DHL = 5	Banha + óleo de soja	20% PTN 60% LP 20% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	30 Pré- prenhez + Prenhez + Lactação	84	M	Visceral (↑ área) (= número)
Yokomizo H, 2014	C57BL/6 J	Controle = 3	Banha + óleo de	18,2% PTN 62,2% LP	18,2% PTN 11,5% LP	Prenhez + Lactação	98	M + F	Visceral (↑ área)

⁴⁸		DHL = 3	soja	19,6% CHO	70,3% CHO				
Zou T, 2017 ⁴⁹	C57BL/6 J	Controle = 8 DHL = 8	Banha + óleo de soja	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	Prenhez + Lactação	77	M	Subcutânea (↑ área) + Visceral (↑ área)

DHL: Dieta Hiperlipídica. NR: Não Relatado. PTN: Proteína. LP: Lipídeos. CHO: Carboidratos. M:Machos. F:Fêmeas.

Tabela 2. Resultados concisos da meta-análise dos desfechos morfológicos (diâmetro, área e número) do tecido adiposo branco visceral e subcutâneo de murinos expostos a dieta hiperlipídica ou dieta controle. DHL/DHL: Descendentes que consumiram dieta hiperlipídica, cujas mães consumiram dieta hiperlipídica. DHL/C: Descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram dieta hiperlipídica.

	MACHOS			FÊMEAS		
	Standardized Mean difference (95% CI)	P	I ²	Standardized Mean difference (95% CI)	P	I ²
VISCERAL						
DIÂMETRO	4,12(-0,61-8,85)	0,09	85%	1,36 (0,31-2,41)	0,01	NA
ÁREA	1,25(0,19-2,32)	0,02	24%	2,61(1,47-6,91)	<0,00001	1%
NÚMERO	0,68(-0,23-1,58)	0,14	12%			
DHL/DHL						
SUBCUTÂNEO						
DIÂMETRO	4.08(2,37-5,79)	P<0,00001	19%			
ÁREA	1,42(-0,27-3,12)	0,10	NA			
NÚMERO	0,13(-0,67-0,94)	0,74	0%			
VISCERAL						
DIÂMETRO	0,65(-2,62-3,91)	0,7	93%			
ÁREA	0,59(0,14-1,04)	0,01	0%	0,65(-0,14-2,77)	0,11	0%
NÚMERO	0,42(-0,59-1,42)	0,42	73%	-0,67(-1,85-0,51)	0,27	NA
DHL/C						
SUBCUTÂNEO						
DIÂMETRO	0,08(-1,05-1,21)	0,89	NA			
ÁREA	-0,79(-2,10-0,51)	0,23	58%	4,21(1,54-6,89)	0,002	NA
NÚMERO	0,25(-1,23-1,74)	0,74	76%			

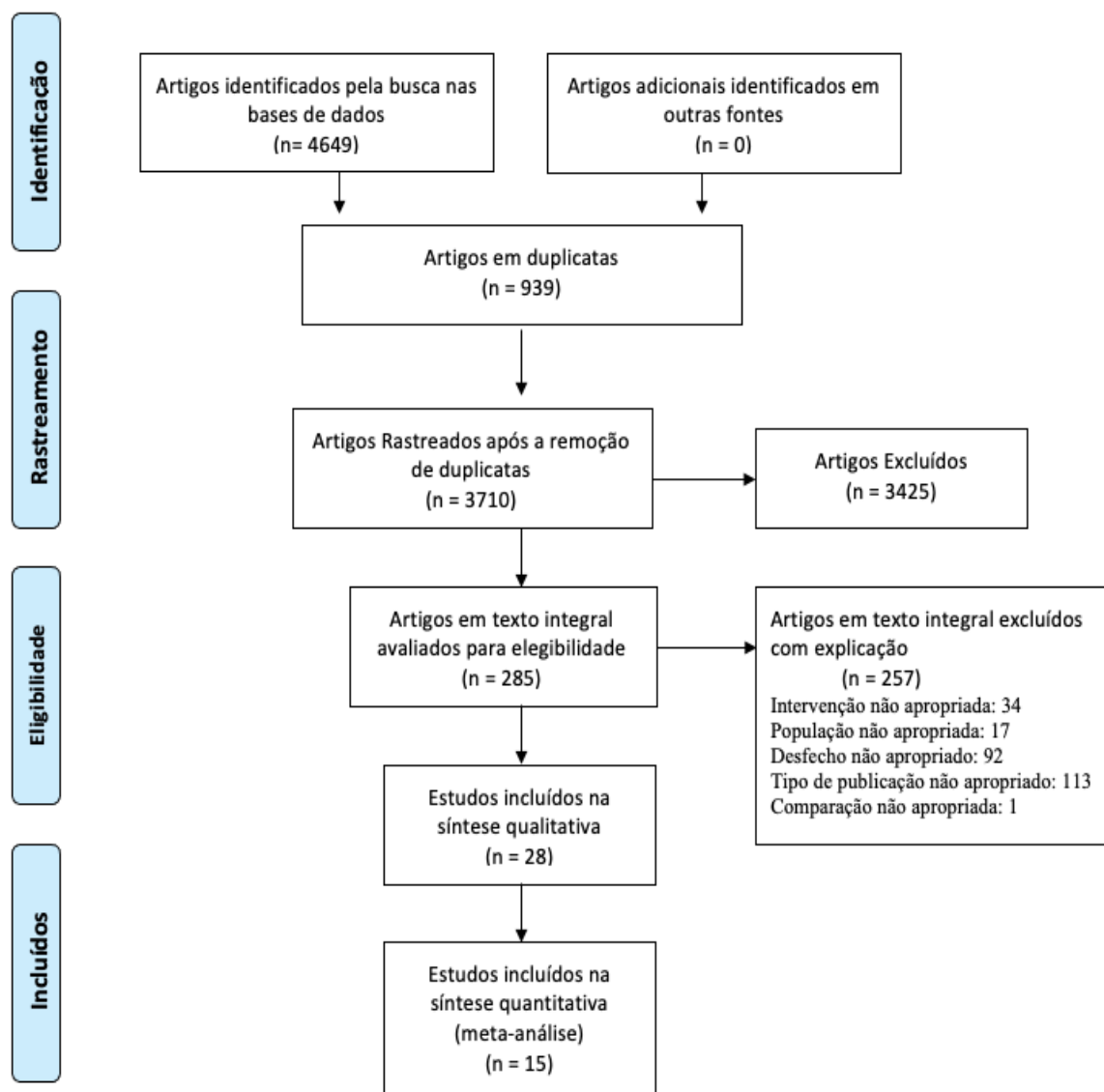


Figura 1. Fluxograma da seleção de artigos para a revisão sistemática e meta-análise.

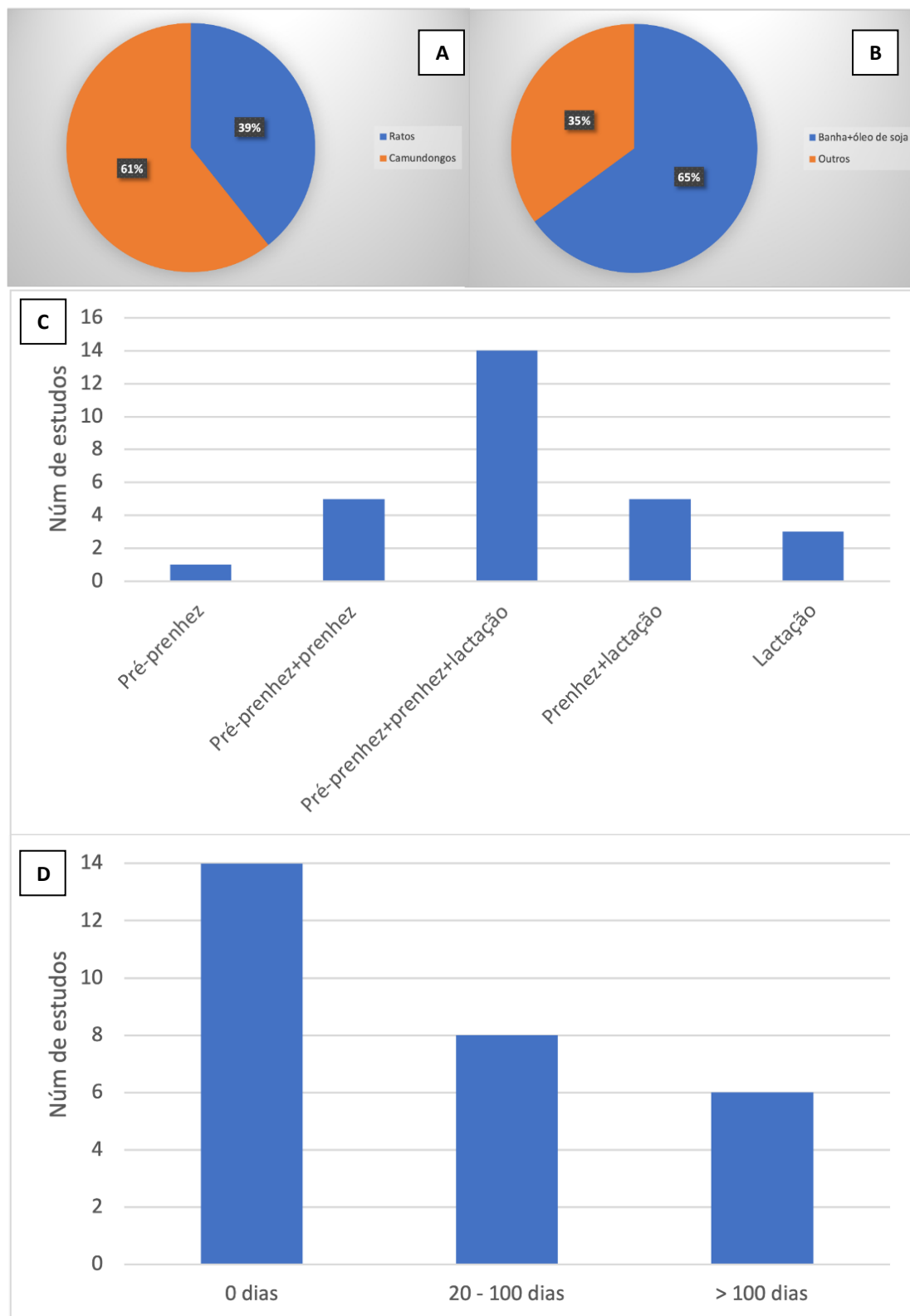
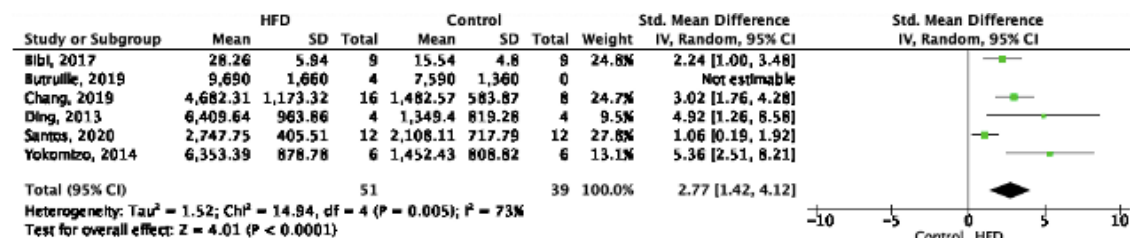


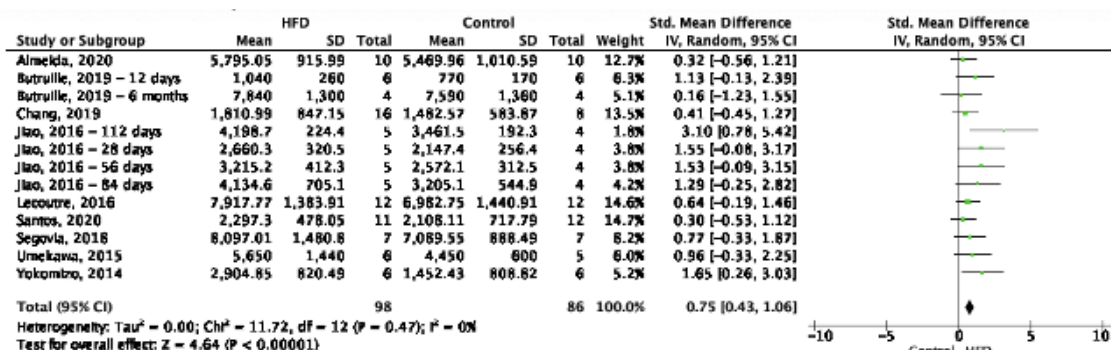
Figura 2. **A-** Distribuição de animais utilizados; **B-** Fonte de gordura utilizada para a produção da dieta hiperlipídica; **C-** Período de consumo da dieta hiperlipídica pelas mães (pré-prenhez; pré-prenhez e prenhez; pré-prenhez, prenhez e lactação; prenhez e lactação e lactação); **D-** Tempo de consumo da dieta hiperlipídica pelos descendentes nos estudos incluídos na

revisão sistemática.

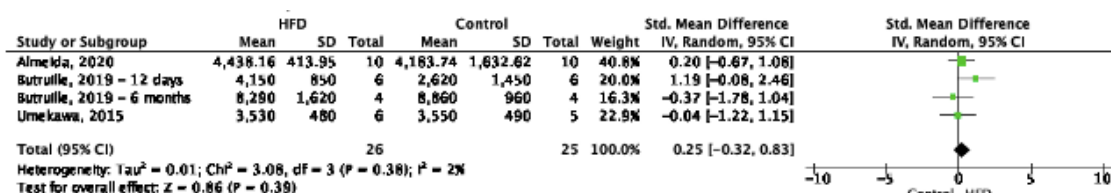
1. Área dos adipócitos do tecido adiposo visceral de descendentes que consumiram DHL, cujas mães consumiram DHL



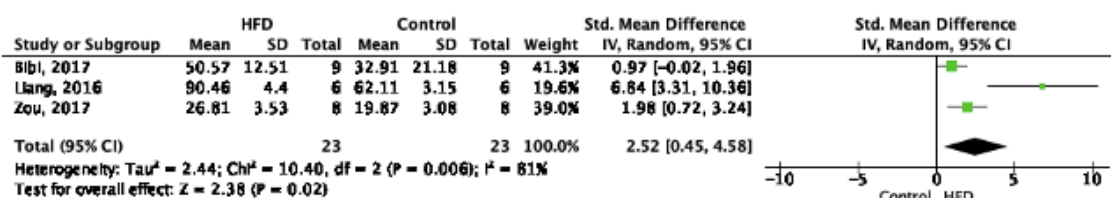
2. Área dos adipócitos do tecido adiposo visceral de descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram DHL



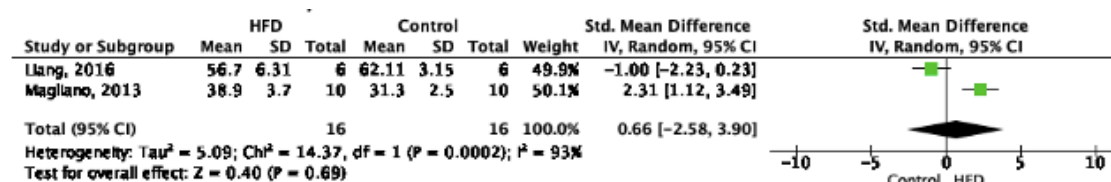
3. Área dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo de descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram DHL



4. Diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo visceral de descendentes que consumiram DHL, cujas mães consumiram DHL



5. Diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo visceral de descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram DHL



6. Diâmetro dos adipócitos do tecido adiposo subcutâneo de descendentes que consumiram DHL, cujas mães consumiram DHL.

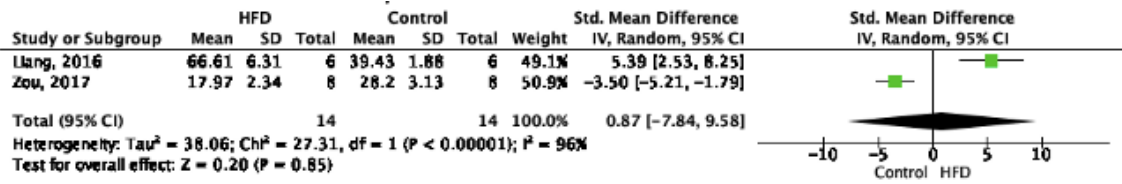
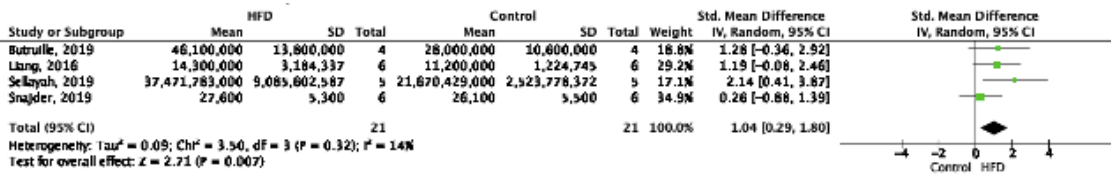
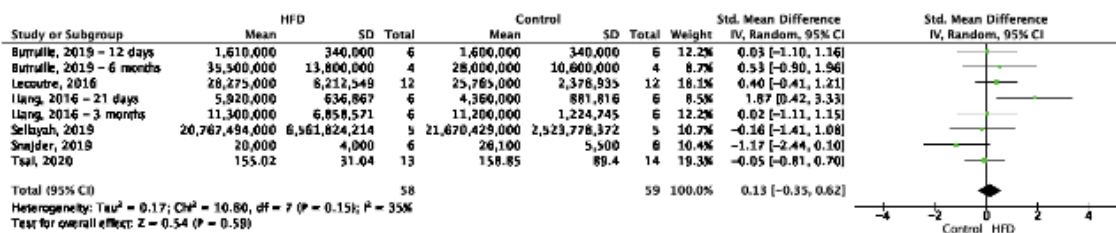


Figura 3. *Forest plot* da meta-análise dos desfechos principais. Área e diâmetro dos adipócitos das regiões viscerais e subcutânea. 1. 2. 3. 4. 5. 6. 95% CI, 95% intervalo de confiança; IV, inverso da variância; DHL, dieta hiperlipídica.

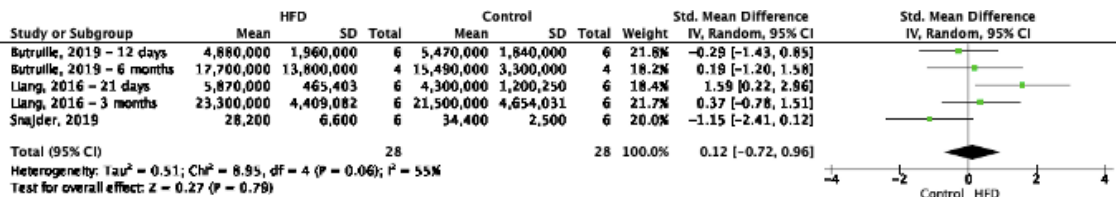
1. Número de adipócitos do tecido adiposo visceral de descendentes que consumiram DHL, cujas mães consumiram DHL



2. Número de adipócitos do tecido adiposo visceral de descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram DHL



3. Número de adipócitos do tecido adiposo subcutâneo de descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram DHL



4. Número de adipócitos do tecido adiposo subcutâneo de descendentes que consumiram DHL, cujas mães consumiram DHL

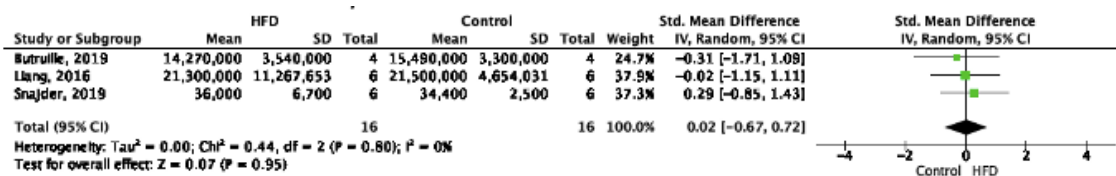
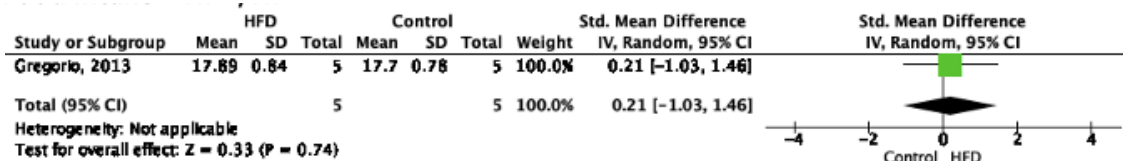
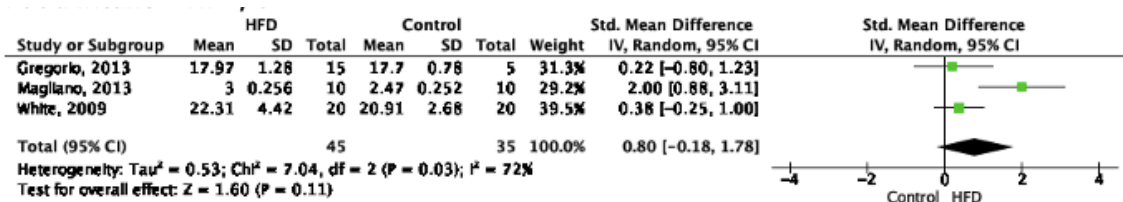


Figura 4. Forest plot da meta-análise dos desfechos principais. Número dos adipócitos das regiões viscerais e subcutânea. 1. 2 3. 4. 95% CI, 95% intervalo de confiança; IV, inverso da variância; DHL, dieta hiperlipídica.

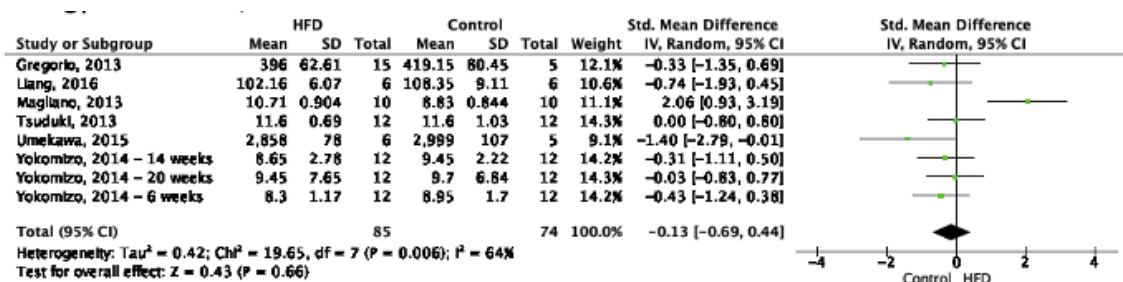
1. Consumo de ração de descendentes que consumiram DHL, cujas mães consumiram DHL



2. Consumo de ração de descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram DHL



3. Consumo energético de descendentes que consumiram dieta controle, cujas mães consumiram DHL



4. Consumo energético de descendentes que consumiram DHL, cujas mães consumiram DHL

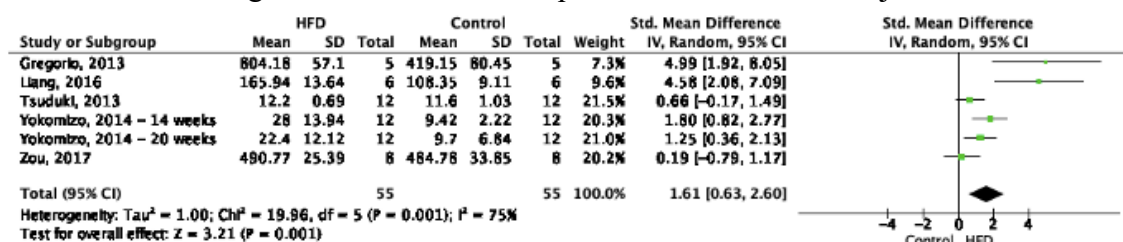


Figura 5. Forest plot da meta-análise dos desfechos do consumo alimentar em ração e em Energia 1. 2 3. 4. 95% CI, 95% intervalo de confiança; IV, inverso da variância; DHL, dieta hiperlipídica.

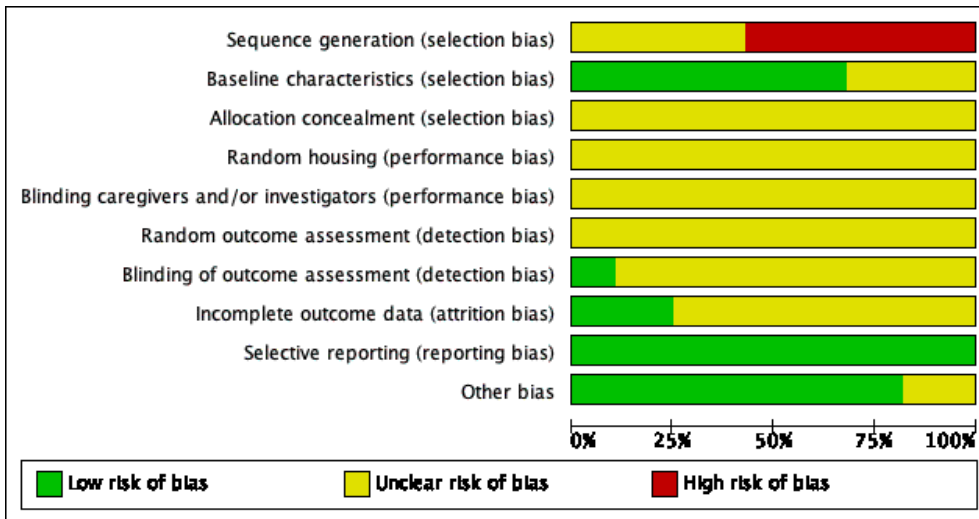


Figura 6. Risco de viés dos estudos incluídos para a revisão Sistemática.

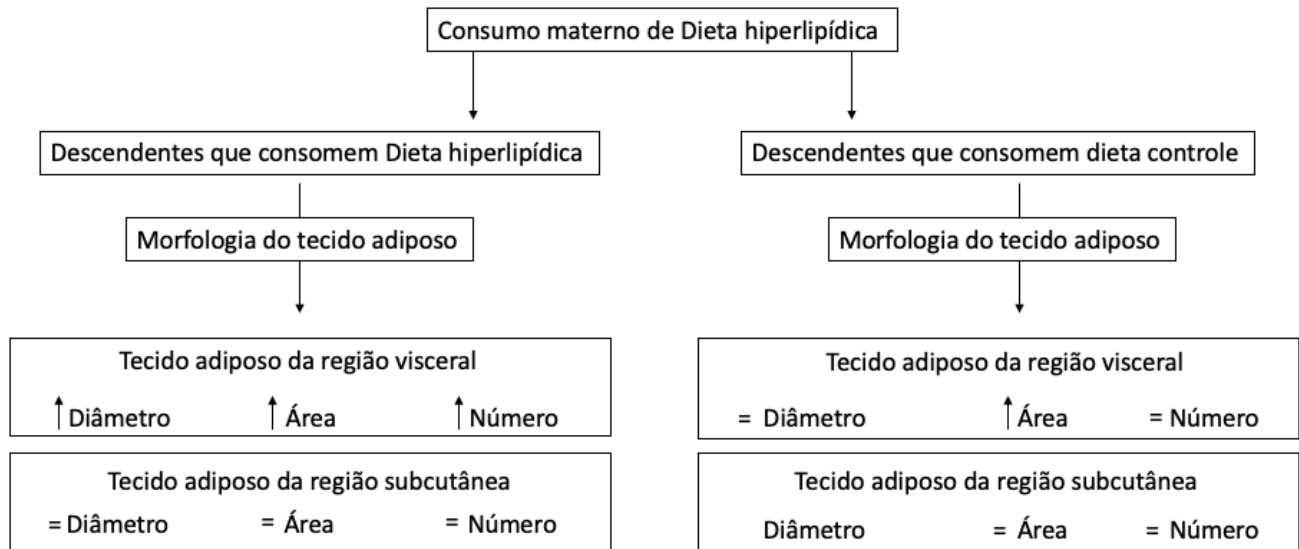


Figura 7: Fluxograma dos desfechos principais encontrados na meta-análise.

Exposição à hiperglicemia materna e consumo de dieta hiperlipídica após o desmame de ratas: Repercussões no tecido adiposo periovariano

Palavras-chave: Tecido adiposo, dieta hiperlipídica, descendentes, diabetes, obesidade

Título curto: Efeitos da programação fetal no tecido adiposo periovariano

Carolina M. Saullo¹, Yuri K. Sinzato¹, Verônyca G. Paula¹, Franciane Q. G. Souza¹, José E. Corrente², Gustavo T. Volpato³, Débora C. Damasceno^{1*}

¹Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Postgraduate Course on Tocogynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.

²Sigma Scientific Consulting and Research Support Office, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (Unesp), Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.

³Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil.

**Corresponding author:* Profa. Dra. Débora C Damasceno

Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia -
UNIPEX

Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp

Distrito de Rubião Júnior s/n

CEP 18610.879 - Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil

Phone/Fax: (+55 14) 38801631

e-mail: debora.damasceno@unesp.br

RESUMO

Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a hiperglicemia materna pode alterar a programação dos descendentes levando a efeitos transgeracionais, como aumento da adiposidade nos descendentes, aumento da suscetibilidade ao desenvolvimento de obesidade e riscos metabólicos adversos que podem persistir desde a infância até a idade adulta. Essas alterações, somadas a fatores ambientais como o consumo de dieta ocidental rica em gordura e atividade física reduzida, também contribuem significativamente para o aparecimento de comorbidade na vida adulta dos descendentes. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da dieta hiperlipídica após o desmame, associada ou não ao ambiente intrauterino hiperglicêmico, no tecido adiposo periovariano de descendentes na idade adulta. O diabetes materno foi induzido quimicamente por droga beta-citotóxica (streptozotocin) e a dieta hiperlipídica foi preparada com enriquecimento de banha de porco e oferecida desde o desmame até a vida adulta dos descendentes. Aos 120 dias de vida, as ratas (filhas) foram anestesiadas e decapitadas para obtenção de amostras de tecido adiposo. De acordo com os achados, o ambiente intrauterino hiperglicêmico, associado ao consumo de DHL após o desmame dos descendentes, causou aumento do peso corpóreo, da gordura total e da gordura periovariana, a qual pode comprometer a futura função reprodutiva das fêmeas. Estes descendentes adultos apresentaram elevado índice de adiposidade e área dos adipócitos, gerando um tecido adiposo hipertrofiado. Portanto, o diabetes materno, por si só causa alterações intergeracionais e, em associação com o consumo de dieta hiperlipídica após o desmame, exacerbou as alterações no tecido adiposo das descendentes fêmeas adultas.

INTRODUÇÃO

A prevalência de diabetes na gravidez tem aumentado mundialmente.¹ Em 2019, dados da Federação Internacional de Diabetes (IDF) mostraram que uma em cada seis gestações foi afetada pelo diabetes.² Além do aumento da prevalência do *Diabetes mellitus* (DM) pré-gestacional (tipo 1 e tipo 2) em mulheres de idade reprodutiva, há um aumento dramático nas taxas de *Diabetes mellitus* gestacional (DMG),³ sendo 13,6% das gestações afetadas pelo diabetes pré-gestacional e 86,4% afetadas pelo DMG.²

Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a hiperglicemia materna pode alterar a programação dos descendentes levando a efeitos transgeracionais,² como aumento da adiposidade nos descendentes, independente do peso ao nascer,⁴⁻⁶ aumento da suscetibilidade de obesidade e riscos metabólicos adversos que podem persistir desde a infância até a idade adulta dos descendentes.^{7,8} Essas alterações, somadas a fatores ambientais como o consumo de dieta ocidental rica em gordura e baixa atividade física, contribuem significativamente para o aumento da prevalência de sobrepeso, obesidade, DM2, DMG⁹⁻¹¹ e alterações reprodutivas¹² na vida adulta dos descendentes, independentemente do tipo de diabetes materno (diabetes pré-gestacional ou DMG).¹³ A exposição a condições adversas intrauterinas pode levar a mudanças permanentes na estrutura e função dos principais sistemas fisiológicos do feto em desenvolvimento.¹⁴ Em roedores, os ovários são envoltos por tecido adiposo visceral. Esses depósitos de gordura na região periovariana não existem em humanos, mas são altamente análogos com relação as funções da gordura visceral omental^{15,16}, sugerindo que a interação parácrina entre o tecido adiposo periovariano e ovários é importante para a foliculogênese normal.¹⁷

O acúmulo de gordura ou a expansão deste tecido se dá pelo processo de hiperplasia (aumento no número de células) ou hipertrofia (aumento na área/volume das células) dos adipócitos.¹⁸ É encontrado nas regiões viscerais ou subcutâneas¹⁹ e possui especificidade celular em cada região, sendo mais propenso à hiperplasia na região subcutânea e a hipertrofia na região visceral.²⁰ A obesidade é um fator de risco independente para o aumento nas complicações metabólicas, incluindo desordens reprodutivas²¹, embora o exato mecanismo pelo qual a obesidade afeta as funções ovarianas ainda não seja amplamente conhecido.

Em função de diversas variáveis incontroláveis e aspectos éticos envolvidos nos estudos em humanos, é necessário o uso de animais de laboratório de forma extremamente ética para mimetizar as condições do diabetes pré-gestacional e de modelos de obesidade

em ratos. Os descendentes advindos de um ambiente intrauterino hiperglicêmico apresentam alterações no perfil metabólico com relação à tolerância à glicose, ou seja, o diabetes materno (período de prenhez e lactação) transmite uma tendência diabetogênica aos descendentes.²² A presença de hiperglicemia materna cria um ambiente intrauterino desfavorável e altera a programação fetal. Isso interfere no desenvolvimento das gônadas fetais femininas com a redução de peso, diâmetro e volume dos ovários, número de folículos ovarianos e diâmetro folicular nestas descendentes,²³ reduzindo assim a taxa de fertilidade das descendentes fêmeas (dados não publicados). Associado a estes achados, as descendentes adultas apresentam, ao final de prenhez, hiperglicemia, fetos com menores pesos corpóreos, placentas e eficiência placentária reduzidas (dados não publicados).

A obesidade induzida por dieta hipercalórica ou hiperlipídica (DHL) em modelos animais já provou ser eficaz para modificar o tecido adiposo.^{9, 24-26} O consumo crônico de DHL pelas mães influencia o desenvolvimento do tecido adiposo branco visceral de seus descendentes com relação à morfologia (área, diâmetro e número dos adipócitos), especialmente quando os mesmos mantêm o consumo de DHL na vida pós-natal. Porém, se o consumo for modificado para uma dieta padrão pelos descendentes, há diferença em relação à hipertrofia adipocitária e a região do tecido adiposo comparando-se os gêneros, sendo verificada hipertrofia na região visceral dos machos e na região subcutânea das fêmeas.²⁷⁻²⁹

A expansão hipertrófica do tecido adiposo periovariano é associada com a formação de uma estrutura em forma de coroa (CLS) e inflamação em ratas com obesidade induzida pela dieta.³⁰ Tal confirmação é importante dada a proximidade do tecido adiposo ao ovário e a habilidade do estrogênio de regular a expansão do tecido adiposo e inflamação^{31,32}. Embora humanos e ratos tenham diferenças nos depósitos de gordura periovarianos, as citocinas inflamatórias sintetizadas do tecido adiposo intra-abdominal podem potencialmente impactar os ovários devido a proximidade dos tecidos. As estruturas CLS são predominantemente encontradas no tecido adiposo da região abdominal enquanto as regiões do tecido adiposo subcutâneo estão aparentemente protegidas do aumento da inflamação.³³

Tendo em vista o atual cenário mundial no qual o diabetes materno pode interferir na programação fetal, o consumo de dieta rica hiperlipídica ou hipercalórica vem aumentando exponencialmente e considerando que ratas obesas apresentam alterações reprodutivas e as descendentes oriundas de um ambiente diabético tem fertilidade reduzida, nós hipotetizamos que os descendentes de mães diabéticas e expostas à dieta hiperlipídica após o desmame apresentam modificações no tecido adiposo periovariano, as quais podem levar a disfunções reprodutivas na vida adulta. Desta forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da dieta hiperlipídica

após o desmame, associada ou não ao ambiente intrauterino hiperglicêmico, no tecido adiposo periovariano de ratas na idade adulta.

MÉTODO

Animais

Foram utilizados ao total 52 Ratos (8 machos e 44 fêmeas) da linhagem *Sprague-Dawley* adquiridos do Biotério da Universidade Estadual de Campinas (CEMIB/UNICAMP) e mantidos no Biotério do Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu_Unesp sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($60\pm 10\%$) e ciclo claro/escuro (12h). Água filtrada e ração foram oferecidas *ad libitum* para os animais, que foram mantidos em caixa de polietileno em cama de maravalha no número de 3 animais por caixa.

Aspectos Éticos

Todos os procedimentos foram submetidos e aprovados pela CEUA Institucional, com número de protocolo 1335/2019.

Sequência experimental

Sequência experimental da geração parental

A sequência experimental dos animais da geração parental teve como objetivo criar um ambiente intrauterino inadequado levando à programação fetal a partir da indução do diabetes. A indução do diabetes foi feita em fêmeas recém-nascidas ($n=10$) com uso da droga beta-citotóxica *Streptozotocin* (STZ, Sigma Aldrich®), na dose de 70 mg/kg via subcutânea no 5º dia de vida pós-natal.³⁴ As fêmeas do grupo não-diabético (controle, $n=6$) receberam volume do veículo (tampão citrato) correspondente ao do grupo que recebeu a droga diabetogênica. Os recém-nascidos machos não foram utilizados neste experimento e, portanto, foram mortos por decapitação. Aos 75 dias de vida das ratas, o Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG) foi realizado para avaliação dos valores glicêmicos, que caracterizou os critérios de inclusão das ratas nos grupos com diabetes.³⁵ Para isso, após seis horas de jejum, foi coletada uma gota de sangue da cauda das ratas para determinação glicêmica (tempo 0). Logo após, as ratas receberam solução de glicose (0,2 g/mL) via intragástrica (*gavage*) na dose de 2,0 g/kg de peso corpóreo. Decorridos 30, 60 e 120 minutos após a administração da solução de glicose, as glicemias também foram determinadas com uma pequena perfuração com agulha (23G) na extremidade distal da cauda do animal, permitindo assim a coleta de uma gota de sangue que foi introduzida em glicosímetro

convencional, com valores limites ≥ 200 mg/dL, em qualquer ponto do teste para confirmação do diabetes. Os animais que receberam o STZ e apresentaram o TOTG inalterado, bem como as ratas do grupo não-diabético que apresentaram TOTG alterado, foram excluídos dos respectivos grupos.

Período de acasalamento, prenhez e amamentação

Na idade adulta, a partir dos 90 dias de vida, as ratas Diabéticas (n=8) e Controle (n=6) passaram pelo período de acasalamento até atingir o número experimental, que teve duração máxima de 15 dias, correspondente a pelo menos três ciclos estrais. As ratas foram distribuídas três a três em gaiolas de polietileno com cama de maravalha. Ao final da tarde, após as 17 horas, um rato macho foi colocado na gaiola das fêmeas. Na manhã subsequente, os machos foram retirados e os esfregaços vaginais foram colhidos pela introdução de Cotonete® embebido em água destilada. Após análise do material depositado nas lâminas em microscópio biológico, a confirmação da prenhez foi realizada pela presença de espermatozoides, sendo este considerado o dia zero de prenhez. De acordo com resultados prévios de nossos trabalhos, cerca de 20% das ratas diabéticas são inférteis e, das que apresentam esfregaço vaginal positivo, em torno de 10% das ratas não atingem a prenhez a termo devido às complicações causadas pela hiperglicemia, logo iniciamos com um número maior de ratas neste grupo. Durante a prenhez, as ratas foram mantidas em caixas individuais e a prole foi obtida através de parto vaginal. Após o nascimento, os recém-nascidos fêmeas foram mantidos com suas mães desde a lactação até o período de desmame (22 dias de vida). Após o desmame, esses animais foram distribuídos nos grupos experimentais correspondentes. Os animais excedentes foram disponibilizados para uso em outro experimento.

Sequência experimental das descendentes de mães diabéticas ou mães controle (Figura 1).

Cálculo do tamanho amostral

Para o cálculo do tamanho amostral, foram considerados os valores de média e desvios-padrão das glicemias obtidas na área sob a curva (AUC) de experimentos prévios considerando uma confiabilidade de 95%, poder de 90% e margem de erro de 5%, o tamanho amostral calculado foi de 5 animais por grupo.

Grupos Experimentais

Logo após o desmame, as ratas foram distribuídas por sorteio de forma pseudo-randomizada (respeitando o máximo de duas ratas de cada ninhada por grupo

experimental) em quatro grupos experimentais (n=5 animais/grupo): 1. Ratas descendentes de mães controle e que receberam dieta padrão (FConDP); 2. Ratas descendentes de mães controle e que receberam dieta hiperlipídica (FConDHL); 3. Ratas descendentes de mães diabéticas e que receberam dieta padrão (FDmod DP) e 4. Ratas descendentes de mães diabéticas e que receberam dieta hiperlipídica (FDmod DHL).

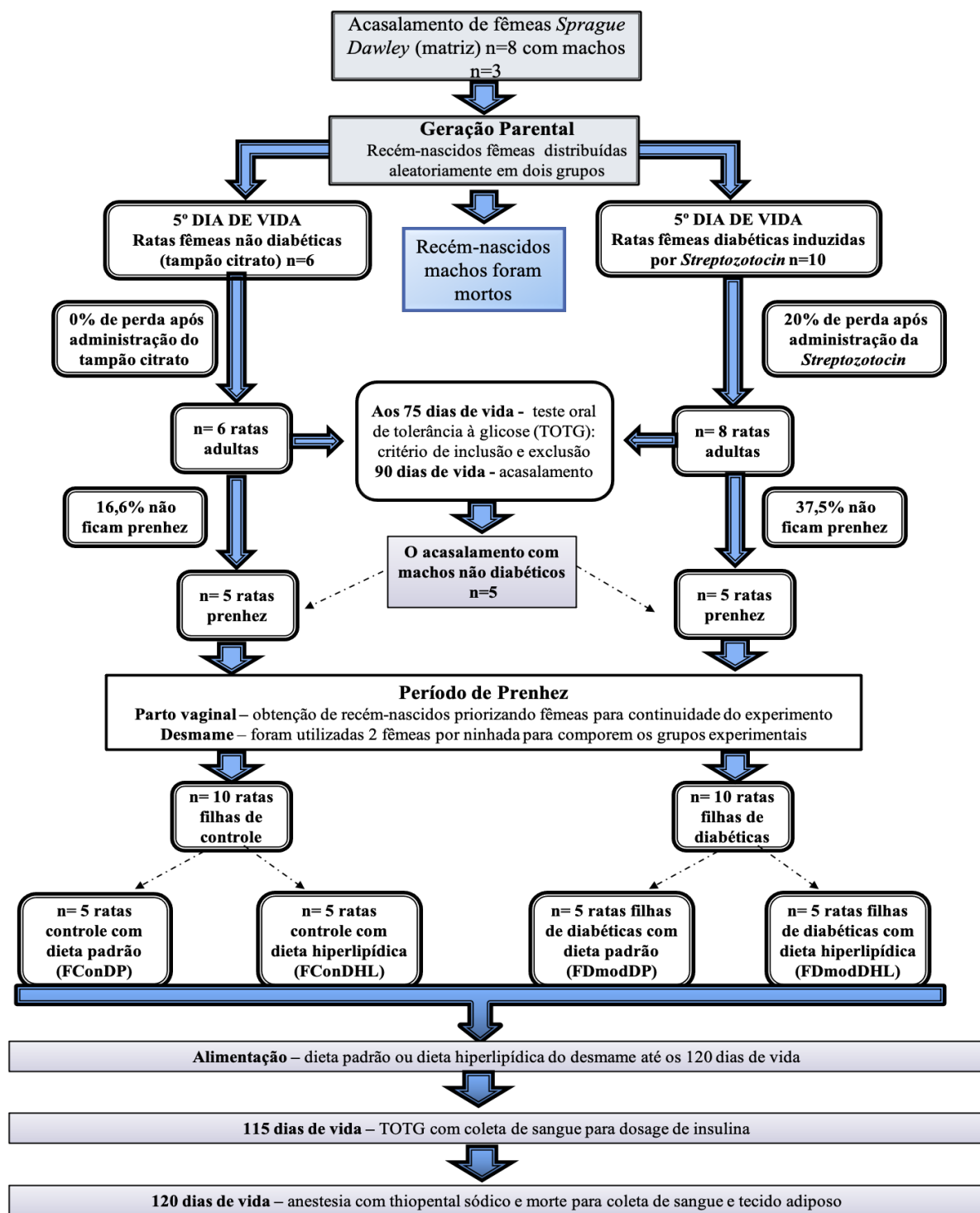


Figura 1. Sequência experimental.

Dieta padrão ou hiperlipídica

As ratas descendentes de mães controle e Dmod receberam dieta comercial padrão (ração Purina, Purina®, Brasil) ou dieta rica em gordura de acordo com o grupo experimental desde o desmame até a idade adulta (120 dias de vida). A dieta rica em gordura foi preparada na Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu e foi composta por farelo de soja (40,0%), sorgo (9,0%), casca de soja (13,7%), amido de milho (2,3%), açúcar refinado (17,6%), banha de porco (16,4%), mistura de vitamina e sais minerais (1%). Após o preparo, os alimentos foram mantidos sob refrigeração até o momento do consumo dos animais.

Teste oral de tolerância à glicose (TOTG)

Aos 115 dias de vida, foi realizado o TOTG para avaliação da intolerância à glicose conforme descrito anteriormente. No TOTG, além da glicemia, a insulina sérica foi avaliada nos momentos 0, 30, 60 e 120 min através de coleta de sangue pela extremidade da cauda do animal utilizando *kits* comerciais e leitura em microplacas. A resposta total da glicose foi avaliada pela estimativa através do cálculo da área sob a curva (AUC), usando o método trapezoidal.³⁶

Morte dos animais e análise morfológica dos adipócitos

Aos 120 dias de vida, as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax® - 120 mg/kg via intraperitoneal) seguida de morte por decapitação, e submetidas à laparotomia para retirada das amostras do tecido adiposo.

As amostras de tecido adiposo periovariano foram pesadas, colocadas em solução fixadora (formalina tamponada) por 24h e, em seguida, acondicionadas em etanol 70%. Os fragmentos foram processados e incluídos em parafina para posterior corte em micrótomo rotativo. As amostras do tecido adiposo dos animais foram coradas com hematoxilina-eosina (H&E). Após esse processo, as imagens foram analisadas no microscópio com ampliação de 20X para possibilitar a contagem do número de células adiposas e cálculo da área das mesmas através do software *ImageJ*. Foram considerados adipócitos grandes, aqueles cuja área era superior ou igual a 4,58 μm^2 , médios aqueles cuja área se encontrava entre 1,03 e 4,57 μm^2 e pequenos aqueles cuja área era menor ou igual a 1,02 μm^2 .³⁷

Análise Estatística

Para a comparação das médias e razões foram utilizados os seguintes testes: testes de comparações múltiplas de Tukey, Teste t de Student e Poisson seguido do teste de comparação múltipla de Wald e Distribuição Binomial negativa seguido do teste de comparação múltipla de Wald. Para o cálculo das comparações entre as proporções dos adipócitos, foi utilizado o teste Qui-quadrado. Para as análises de correlações, foi usado o teste de Pearson. $P < 0,05$ foi considerado como limite de significância estatística.

RESULTADOS

Como demonstrado na Tabela 1, foram encontrados aumentos significativos nos pesos corpóreos, de gordura total e no peso do tecido adiposo periovariano dos descendentes advindos de mães com hiperglicemia e que foram expostas pós-natalmente à dieta hiperlipídica (FDmodDHL) quando comparados aos descendentes FConDP.

Com relação ao índice de adiposidade, foi encontrada diferença significativa entre descendentes FDmodDHL quando comparados aos descendentes FConDP. A razão entre o peso do tecido adiposo periovariano e o peso corpóreo não apresentou diferença significativa entre os grupos, assim como a razão entre o número de adipócitos e o peso corpóreo e a razão entre o número de adipócitos e o peso do tecido adiposo periovariano. Houve aumento significativo na razão entre a área dos adipócitos e o peso corpóreo e na razão entre área dos adipócitos e o peso do tecido adiposo periovariano no grupo FDmodDHL em relação ao grupo FConDP (Tabela 1).

O cálculo da área sobre a curva (AUC) dos valores glicêmicos obtidos durante o TOTG apresentou aumento significativo nos grupos FConDHL, FDmodDP e FDmod DHL quando comparados ao grupo FConDP, tanto com relação à somatória quanto ao nível de glicose circulante por minuto, sendo que o grupo FDmodDHL mostrou maior aumento desses parâmetros em comparação aos demais grupos (Tabela 1).

Quando foi avaliada a correlação (Tabela 2) entre o número de adipócitos, área dos adipócitos, peso corpóreo, peso do tecido adiposo periovariano, peso da gordura total e índice de adiposidade, foi encontrada uma correlação positiva entre o peso corpóreo e a área dos adipócitos ($r = 47\%$, $p = 0,02$), assim como entre o peso do tecido adiposo periovariano e a área dos adipócitos ($r = 65\%$, $p = 0,0006$), o peso da gordura total e a área dos adipócitos ($r = 66\%$, $p = 0,0005$) e o índice de adiposidade e a área dos adipócitos ($r =$

62%, $p = 0,0015$). Também houve correlação positiva entre o peso corpóreo e o peso do tecido adiposo periovariano ($r = 43\%$, $p = 0,03$) e entre o peso corpóreo e o peso da gordura total ($r = 48\%$, $p = 0,02$). O peso do tecido adiposo periovariano e o peso da gordura total ($r = 80\%$, $p < 0,0001$), assim como o peso do tecido adiposo periovariano e o índice de adiposidade ($r = 78\%$, $p < 0,0001$), e o peso da gordura total e o índice de adiposidade ($r = 99\%$, $p < 0,0001$) mostraram correlação positiva.

Com relação à classificação do tamanho das áreas dos adipócitos, houve maior frequência de adipócitos grandes no grupo FConDHL comparado ao grupo FConDP e maior frequência no grupo FDmodDHL quando comparado aos outros três grupos (FConDP, FConDHL e FDmodDP). Para os adipócitos de tamanho médio, o grupo FConDHL apresentou maior frequência quando comparado ao grupo FConDP, mas o grupo FDmodDHL teve redução de adipócitos médios em relação aos outros grupos. Quanto aos adipócitos pequenos, o grupo FConDHL mostrou maior frequência do que o grupo FConDP (Figuras 2 e 3).

DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que os descendentes que foram expostas a um ambiente intrauterino desfavorável (hiperglicemia materna) e que consumiram uma dieta hiperlipídica (DHL) após o desmame apresentaram maior peso de gordura total, peso da gordura periovariana e índice de adiposidade, contribuindo para o maior peso corpóreo. Estes descendentes (FDmodDHL) também tiveram maior área de adipócitos, com seja em relação ao peso corpóreo quer seja em relação ao peso de gordura periovariana. Estas alterações do tecido adiposo podem ter contribuído para o aumento das concentrações glicêmicas aferidas durante o teste oral de tolerância à glicose, que confirmou um estado de intolerância à glicose desses animais pelos valores aumentados da área sob a curva. As análises de correlação mostraram que quanto maior o peso da gordura total, o peso do tecido adiposo periovariano e o índice de adiposidade, maior foi o peso corpóreo total das descendentes FDmodDHL. Essa relação também se estabeleceu entre o aumento da área dos adipócitos (evidenciado pela maior porcentagem de adipócitos médios e grandes) com os diferentes tipos de peso (corpóreo, gordura total e tecido adiposo periovariano). Além disso, houve relação significativa com o índice de adiposidade aumentado nestas fêmeas FDmodDHL adultas. Porém nenhum desses parâmetros teve correlação com o número dos adipócitos, mostrando maior efeito da hipertrofia adipocitária do que da hiperplasia.

O aumento da área e a diminuição do número dos adipócitos nos descendentes do grupo FDmodDHL demonstra que quanto maior a área dessas células, menor a quantidade de células neste tecido. A obesidade hipertrófica tem como característica possuir um tecido adiposo com infiltração de macrófagos, o que prejudica o processo de adipogênese (processo de diferenciação dos adipócitos). Isto é, o tecido adiposo quando hipertrofiado, inibe a cascata de sinalização responsável pelo aumento no número de células nesse tecido.³⁸ Neste estudo, nós verificamos que a DHL alterou o tamanho dos adipócitos, mas de forma diferente em função do ambiente intrauterino ao qual a descendente foi exposta. Houve maior porcentagem de adipócitos de tamanho médio nos descendentes advindos de mães não-diabéticas e aumento na porcentagem de adipócitos grandes daqueles oriundos de mães diabéticas. De forma geral, o consumo de DHL após o desmame promoveu aumento do tamanho das células do tecido adiposo dos descendentes, mostrando uma hipertrofia tecidual e tendo como consequência maior peso da gordura.

O tecido adiposo com hiperplasia sintetiza e secreta adipocinas pró-inflamatórias em quantidades fisiológicas, além disso, sintetiza e secreta adipocinas anti-inflamatórias e apresenta efeitos metabólicos protetores.^{39,40} Já o tecido adiposo hipertrofiado sintetiza e secreta maiores quantidades de adipocinas pró-inflamatórias,⁴¹ o que contribuiu negativamente para o aparecimento de outras comorbidades nestas descendentes fêmeas adultas.

Estudos em animais demonstram que a impressão metabólica causada pelo ambiente intrauterino obeso ou diabético pode ser transmitida através de gerações.⁴² Além disso, o diabetes materno aumenta o risco para o aparecimento de DM Tipo 2 nos índios Pima jovens, portanto fechando o ciclo vicioso postulado pelo qual “diabetes gera diabetes”.⁴³ Dados semelhantes foram relatados entre jovens adultos da Dinamarca expostos ao DM Tipo 1 no período intraútero, sugerindo que os efeitos a longo prazo da exposição à hiperglicemia são semelhantes independentemente do tipo de diabetes.⁴⁴ Os mecanismos responsáveis por esses efeitos não são totalmente claros, mas muitas pesquisas têm sido realizadas envolvendo desde modelos animais a estudos epidemiológicos e mecanísticos.

No entanto, a associação de um ambiente gravídico hiperglicêmico e a exposição pós-desmame à dieta hiperlipídica (DHL) não tem sido explorada. Sendo assim, em função do aumento exponencial de mulheres com diabetes pré-gestacional ou gestacional e devido ao excessivo consumo de alimentos ricos em gordura saturada durante a infância,

adolescência e vida adulta, houve o interesse em se estudar a fusão destas variáveis para compreender as repercussões na vida adulta dos descendentes advindos de mães diabéticas e que passaram a consumir uma dieta rica em gordura após o desmame. Nosso trabalho mostrou que esta associação exacerbou o tamanho dos adipócitos, obtidos do tecido adiposo periovariano, levando a uma hipertrofia adipocitária. Isto pode ser explicado pelo fato da dieta rica em gordura ter causado um desequilíbrio entre consumo e gasto energético^{45,46}, pendendo mais para o consumo, o que resultou no armazenamento de energia nas células do tecido adiposo na forma de triglicerídeos através da lipogênese.⁴⁷ Isso resultou no aumento do tamanho dos adipócitos das fêmeas do grupo FDmodDHL, levando a maior peso da gordura total, peso do tecido adiposo periovariano, índice de adiposidade e, conseqüentemente no aumento do peso corpóreo. Outra justificativa para estes achados seria que, enquanto a glicose materna é transferida para o feto via placenta, a insulina materna não atravessa a membrana placentária em função do seu peso molecular. Frente ao estímulo glicêmico, o pâncreas fetal responde a esta sobrecarga e sintetiza insulina adicional, que por sua vez atua como um hormônio de crescimento fetal levando a seu crescimento e a adiposidade.⁴⁸

Crianças expostos ao diabetes e/ou à obesidade materna durante a gravidez têm maior risco de se tornarem obesos e desenvolver DM Tipo 2 na idade jovem. Muitas das descendentes (sexo feminino) tornam-se obesas e apresentam diabetes ou tolerância anormal à glicose no momento em que atingem a fase fértil, perpetuando assim o ciclo. Ao longo das gerações, este ciclo provavelmente aumenta o risco e/ou antecipa o aparecimento de obesidade e DM Tipo 2.⁴⁸ Apesar das evidências crescentes de que a exposição ao diabetes intraútero está associado a DM2 na prole e pode ser responsável pelo início precoce do que foi considerada, até recentemente, uma doença da idade adulta, não se sabe se essa exposição associada ao consumo de dieta hiperlipídica exagera ou não as anormalidades metabólicas que são precursoras do DM2 e/ou da obesidade na vida adulta. Em nossos achados, verificamos que as ratas que consumiram DHL, ou que foram expostas ao diabetes materno ou que foram submetidas à associação destas duas condições apresentaram picos hiperglicêmicos, com diagnóstico de intolerância à glicose, confirmada pelos valores obtidos nos cálculos da área sob a curva. Já foi demonstrado que recém-nascidos de mães diabéticas apresentam secreção de insulina aumentada frente um estímulo glicêmico e hiperplasia de células beta-pancreáticas.⁴⁹ Outra sugestão é que a secreção de insulina prejudicada também já foi proposta como um mecanismo possível,

mas se este é um fenômeno transitório ou se leva a tolerância à glicose prejudicada mais tarde na vida ainda está em discussão.

Considerando que a janela crítica de desenvolvimento é o período no qual ocorre a formação e o desenvolvimento de diversos órgãos e tecidos, inclusive do tecido adiposo branco no feto,⁵⁰ um insulto materno poderá determinar a vulnerabilidade a possíveis agressões ambientais, como o consumo de DHL.⁵¹

Portanto, podemos concluir que o ambiente intrauterino hiperglicêmico, associado ao consumo de DHL pelos descendentes, incrementou ainda mais o aumento do tamanho dos adipócitos, levando a uma hipertrofia, que contribui para o aumento do peso da gordura periovariana, da gordura total e, consequentemente no maior peso corpóreo e índice de adiposidade dos mesmos. Além disso, a associação diabetes materno e consumo de dieta hiperlipídica pós-desmame acarretou em intolerância à glicose nas descendentes, confirmando o efeito intergeracional do diabetes e a exacerbação após outro insulto ambiental. A partir da compreensão das repercussões de insultos intrauterinos e pós-natal, provavelmente haverá redução na prevalência de obesidade e diabetes tipo 2 na próxima geração e, consequentemente, haverá benefícios para as gerações futuras, bem como para sucessiva geração.

CONFLITO DE INTERESSE

Nenhum conflito de interesse relevante para este artigo foi reportado.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem os alunos da equipe de pesquisa do Laboratório Experimental em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Botucatu, Unesp; ao Sr. Danilo Chaguri e Jurandir Antonio, pelos cuidados e manutenção dos animais.

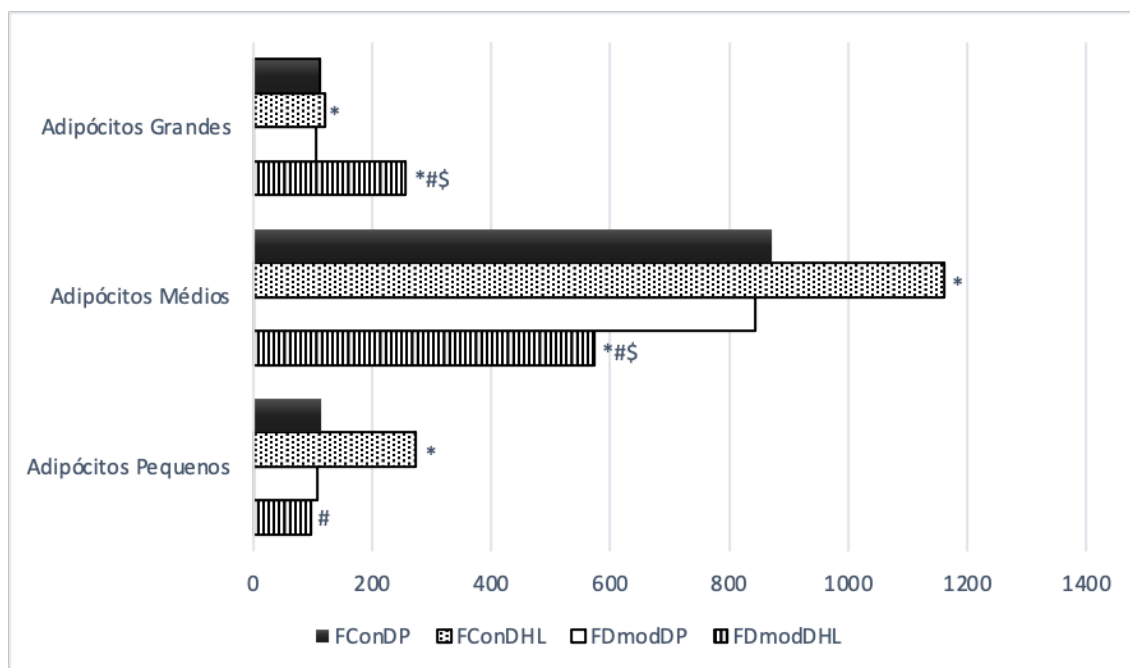
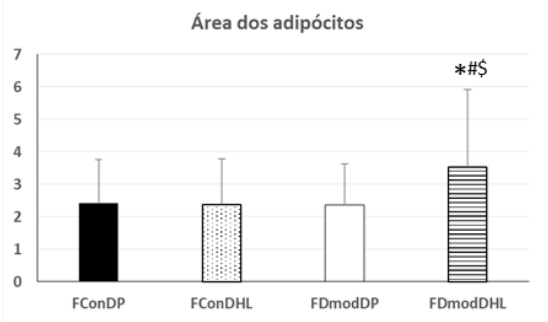
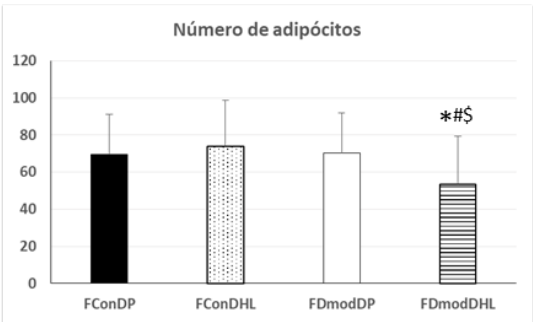
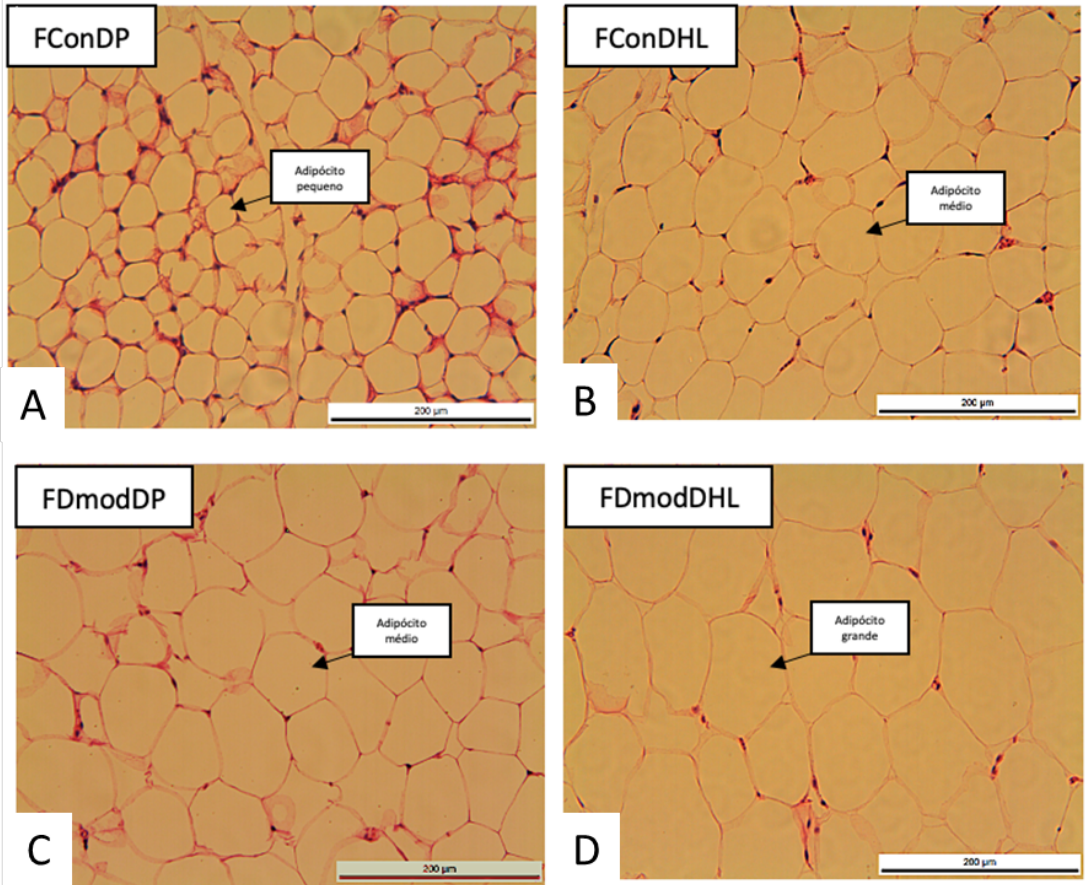


FIGURA 2. Frequência de adipócitos grandes, médios e pequenos dos grupos FConDP, FConDHL, FDmodDP e FDmodDHL aos 120 dias de vida.

Legenda: FConDP (descendentes de mães controle e que consumiram dieta padrão após o desmame), FConDHL (descendentes de mães controle e que consumiram dieta hiperlipídica após o desmame), FDmodDP (descendentes de mães com hiperglicemia e que consumiram dieta padrão após o desmame), FDmodDHL (descendentes de mães com hiperglicemia que consumiram dieta hiperlipídica após o desmame).

* $p < 0,05$ - comparado ao grupo FconDP, # $p < 0,05$ - comparado ao grupo FConDHL, \$ $p < 0,05$ - comparado ao grupo FDmodDP.



E

F

FIGURA 3. Microfotografia de amostras de tecido adiposo periovariano. A. Ratas adultas descendentes de ambiente intrauterino controle e que consumiram dieta padrão após o desmame (FConDP); B. Ratas adultas descendentes de ambiente intrauterino controle e que consumiram dieta hiperlipídica após o desmame (FConDHL); C. Ratas adultas descendentes de ambiente intrauterino hiperglicêmico e que consumiram dieta padrão após o desmame (FDmodDP); D. Ratas adultas descendentes de ambiente intrauterino hiperglicêmico e que consumiram dieta hiperlipídica após o desmame (FDmodDHL). Lâminas coradas com hematoxilina-eosina. Aumento: 20x. E. Média e desvio-padrão do número de adipócitos; F. Média e desvio-padrão da área dos adipócitos (mm²).

*p<0,05- comparado ao grupo FconDP; #p<0,05- comparado ao grupo FConDHL; \$p<0,05- comparado ao grupo FDmodDP (Comparação dois a dois - Teste t de Student).

TABELA 1. Peso corpóreo, da gordura total (periovariana, retroperitoneal e periuterina), do tecido adiposo periovariano; índice de adiposidade [(peso da gordura/peso corpóreo) x100]; razão do peso do tecido adiposo periovariano/peso corpóreo x 100; número de adipócitos/peso corpóreo; área dos adipócitos/peso corpóreo, número de adipócitos/peso do tecido adiposo periovariano; área do adipócito/ peso do tecido adiposo periovariano; área sobre a curva da somatória da glicemia (120 minutos) e área sobre a curva da glicose circulante por minuto.

	FConDP	FConDHL	FDmodDP	FDmodDHL
Peso corpóreo (g)	247,20 ± 5,26 a	264,00 ± 13,25 ab	262,20 ± 24,23 ab	264,12 ± 8,34 b
Peso gordura total (g)	4,75 ± 1,45 a	6,89 ± 1,94 ab	6,02 ± 1,95 ab	8,83 ± 3,32 b
Peso tecido adiposo periovariano (g)	1,08 ± 0,45 a	1,26 ± 0,36 ab	1,10 ± 0,58 ab	1,65 ± 1,09 b
Índice de adiposidade (Peso gordura total / Peso corpóreo) x 100	1,92 ± 0,26 a	2,62 ± 0,29 ab	2,27 ± 0,24 ab	3,29 ± 0,47 b
(Peso tecido adiposo periovariano /Peso corpóreo) x 100	0,44 ± 0,19 a	0,48 ± 0,16 a	0,42 ± 0,18 a	0,62 ± 0,20 a
(Número adipócito / peso corpóreo)	0,21 ± 0,01 a	0,25 ± 0,01 a	0,24 ± 0,01 a	0,22 ± 0,01 a
(Área adipócito / peso corpóreo)	11041,00 ± 1191,13 a	9335,64 ± 851,32 a	10356,00 ± 1117,23 a	15372,00 ± 1513,52 b
(Número adipócito / peso tecido adiposo periovariano)	55,50 ± 3,33 a	56,21 ± 2,83 a	66,84 ± 3,66 a	54,03 ± 3,00 a
(Área adipócito / peso tecido adiposo periovariano)	2.886.491,00 ± 482.760,00 ab	2.041.313,00 ± 288.400,00 a	2.698.047,00 ± 451.009 ab	3.336.160,00 ± 510.157,00 b
AUC (somatória glicemia 120 min)	14529,54 ± 1865,80 a	16174,50 ± 2487,10 b	18174,54 ± 1286,00 b	19365,00 ± 1279,50 c

AUC (glicose circulante por minuto)	121,07 ± 15,54 a	134,78 ± 20,72 b	151,45 ± 10,71 b	161,37 ± 10,66 c
--	---------------------	---------------------	---------------------	---------------------

Legenda: FConDP= descendentes de mães controle e que consumiram dieta padrão após o desmame; FConDHL= descendentes de mães controle e que consumiram dieta hiperlipídica após o desmame; FDmodDP= descendentes de mães com hiperglicemia e que consumiram dieta padrão após o desmame; FDmodDHL= descendentes de mães com hiperglicemia e que consumiram dieta hiperlipídica após o desmame; DP (Desvio-padrão), AUC (área sobre a curva).

Letras diferentes representam diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ($p < 0,05$).

TABELA 2. Correlação entre o número de adipócitos, área de adipócitos, peso corpóreo, peso do tecido adiposo periovariano, peso da gordura total e índice de adiposidade de ratas advindas de ambiente intrauterino hiperglicêmico e que foram expostas a dieta hiperlipídica ou não desde o desmame até a vida adulta (120 dias).

	Número de adipócitos	Área dos adipócitos	Peso Corpóreo	Peso do TA periovariano	Peso da gordura total	Índice de adiposidade
Nº de adipócitos	r = 1	r = -0.05634 p = 0,7985	r = 1784 p = 0,4154	r = -0,11648 p = 0,5966	r = 0,06075 p = 0,783	r = 0,05222 p = 0,8129
Área dos adipócitos	—	r = 1	r = 0,4766* p = 0,0215	r = 0,65835* p = 0,0006	r = 0,66658* p = 0,0005	r = 0,6236* p = 0,0015
Peso Corpóreo	—	—	r = 1	r = 0,4331* p = 0,0390	r = 0,4800* p = 0,0240	r = 0,3640 p = 0,0877
Peso do TA periovariano	—	—	—	r = 1	r = 0,80646* <0,0001	r = 0,78018* <0,0001
Peso da gordura total	—	—	—	—	r = 1	r = 0,99082* <0,0001
Índice de adiposidade	—	—	—	—	—	r = 1

Referências Bibliográficas

1. Poston L, Caleyachetty R, Cnattingius S, et al. Preconceptional and maternal obesity: epidemiology and health consequences. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2016;4(12):1025-1036. doi:10.1016/S2213-8587(16)30217-0
2. IDF Diabetes Atlas 9th edition 2019. Accessed April 20, 2021. <https://www.diabetesatlas.org/en/>
3. Management of diabetes in pregnancy: Standards of medical care in diabetes-2021. *Diabetes Care.* 2021;44(Suppl 1):S200-S210. doi:10.2337/dc21-S014
4. Aris IM, Soh SE, Tint MT, et al. Effect of maternal glycemia on neonatal adiposity in a multiethnic asian birth cohort. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(1):240-247. doi:10.1210/jc.2013-2738
5. Metzger BE, Lowe LP, Dyer AR, et al. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcome (HAPO) study: Associations with neonatal anthropometrics. *Diabetes.* 2009;58(2):453-459. doi:10.2337/db08-1112
6. Lowe WL, Lowe LP, Kuang A, et al. Maternal glucose levels during pregnancy and childhood adiposity in the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome Follow-up Study. *Diabetologia.* 2019;62(4):598-610. doi:10.1007/s00125-018-4809-6
7. Godfrey KM, Gluckman PD, Hanson MA. Developmental origins of metabolic disease: Life course and intergenerational perspectives. *Trends Endocrinol Metab.* 2010;21(4):199-205. doi:10.1016/j.tem.2009.12.008
8. Tam WH, Ma RCW, Ozaki R, et al. In utero exposure to maternal hyperglycemia increases childhood cardiometabolic risk in offspring. *Diabetes Care.* 2017;40(5):679-686. doi:10.2337/dc16-2397
9. Tellechea ML, Mensegue MF, Pirola CJ. The Association between High Fat Diet around Gestation and Metabolic Syndrome-related Phenotypes in Rats: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Sci Rep.* 2017;7(1):5086. doi:10.1038/s41598-017-05344-7
10. Kiss AC, Lima PH, Sinzato YK, et al. Animal models for clinical and gestational diabetes: maternal and fetal outcomes. *Diabetol Metab Syndr.* 2009;1(1):21. doi:10.1186/1758-

5996-1-21

11. Calkins K, Devaskar SU. Fetal Origins of Adult Disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*. 2011;41(6):158-176. doi:10.1016/j.cppeds.2011.01.001
12. Desai M, Jellyman JK, Han G, Beall M, Lane RH, Ross MG. Maternal obesity and high-fat diet program offspring metabolic syndrome. *Am J Obstet Gynecol*. 2014;211(3):237.e1-237.e13. doi:10.1016/j.ajog.2014.03.025
13. Damasceno DC, Sinzato YK, Bueno A, et al. Mild diabetes models and their maternal-fetal repercussions. *J Diabetes Res*. 2013;2013:473575. doi:10.1155/2013/473575
14. Yao S, Lopez-Tello J, Sferruzzi-Perri AN. Developmental programming of the female reproductive system—a review. *Biol Reprod*. 2021;104(4):745-770. doi:10.1093/biolre/ioaa232
15. Tchkonina T, Thomou T, Zhu Y, Karagiannides I, Pothoulakis C, Jensen MD, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013;17(5):644–56.
16. Chusyd DE, Wang D, Huffman DM, Nagy TR. Relationships between rodent white adipose fat pads and human white adipose fat depots. *Front Nutr*. 2016;3:10
17. Yang L, Chen L, Lu X, et al. Peri-ovarian adipose tissue contributes to intraovarian control during folliculogenesis in mice. *Reproduction*. 2018;156(2):133-144. doi:10.1530/REP-18-0120
18. Björntorp P, Sjöström L. Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity. *Metabolism*. 1971;20(7):703-713. doi:10.1016/0026-0495(71)90084-9
19. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-332. doi:10.1016/S1043-2760(00)00301-5
20. Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6676-6681. doi:10.1073/pnas.0601752103
21. Malnick SD, Knobler H. The medical complications of obesity. *QJM* 2006; 99:565-579

22. Aerts L, Van Assche FA. Animal evidence for the transgenerational development of diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(5-6):894-903. doi:10.1016/j.biocel.2005.07.006
23. Khaksar Z, Jelodar G, Hematian H, Poorahmadi M. Alterations of the ovarian histomorphometry at pre-puberty in rat offspring from diabetic mothers. *Reprod Med Biol.* 2013 May 14;12(4):173-178. doi: 10.1007/s12522-013-0151-3.
24. de Almeida MM, Dias-Rocha CP, Reis-Gomes CF, et al. Maternal high-fat diet up-regulates type-1 cannabinoid receptor with estrogen signaling changes in a sex- and depot-specific manner in white adipose tissue of adult rat offspring. *Eur J Nutr.* Published online 2020. doi:10.1007/s00394-020-02318-w
25. dos Santos LS, de Matos RJB, Cordeiro G dos S, et al. Perinatal and post-weaning exposure to an obesogenic diet promotes greater expression of nuclear factor- κ B and tumor necrosis factor- α in white adipose tissue and hypothalamus of adult rats. *Nutr Neurosci.* 2020;0(0):1-9. doi:10.1080/1028415X.2020.1764291
26. Sellayah D, Thomas H, Lanham SA, Cagampang FR. Maternal obesity during pregnancy and lactation influences offspring obesogenic adipogenesis but not developmental adipogenesis in mice. *Nutrients.* 2019;11(3). doi:10.3390/nu11030495
27. Lecoutre S, Deracinois B, Laborie C, et al. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J Endocrinol.* 2016;230(1):39-53. doi:10.1530/JOE-16-0037
28. Litzenburger T, Huber EK, Dinger K, et al. Maternal high-fat diet induces long-term obesity with sex-dependent metabolic programming of adipocyte differentiation, hypertrophy and dysfunction in the offspring. *Clin Sci.* 2020;134(7):921-939. doi:10.1042/CS20191229
29. Parente LB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. *Clin Nutr.* 2008;27(4):623-634. doi:10.1016/j.clnu.2008.05.005
30. Nteebeba J, Ortinau LCC, Perfield JW, Keating AF. Diet-induced obesity alters immune cell

- infiltration and expression of inflammatory cytokine genes in mouse ovarian and peri-ovarian adipose depot tissues. *Molecular Reproduction & Development* 80: 948–958 (2013).
31. Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor alpha knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2000; 97:12729-12734.
 32. Stubbins RE, Najjar K, Holcomb VB, Hong J, Nunez NP. Oestrogen alters adipocyte biology and protects female mice from adipocyte inflammation and insulin resistance. *Diabetes Obesity & Metabolism* 2012; 14:58-66.
 33. Strissel KJ, Stancheva Z, Miyoshi H, Perfield JW, Defuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS. Adipocyte death, adipose tissue remodeling and obesity complications. *Diabetes* 2007; 56:2910-2918.
 34. Sinzato YK, Klöppel E, Miranda CA, et al. Comparison of streptozotocin-induced diabetes at different moments of the life of female rats for translational studies. *Lab Anim*. Published online 2021. doi:10.1177/00236772211001895
 35. Santos TMM, Sinzato YK, Gallego FQ, et al. Extracellular HSP70 levels in diabetic environment in rats. *Cell Stress Chaperones*. 2015;20(4):595-603. doi:10.1007/s12192-015-0581-4
 36. Tai MM. A Mathematical Model for the Determination of Total Area Under Glucose Tolerance and Other Metabolic Curves. *Diabetes Care*. 1994;17(2):152-154. doi:10.2337/diacare.17.2.152
 37. Ibáñez CA, Vázquez-Martínez M, León-Contreras JC, et al. Different statistical approaches to characterization of adipocyte size in offspring of obese rats: Effects of maternal or offspring exercise intervention. *Front Physiol*. 2018;9(NOV):1-13. doi:10.3389/fphys.2018.01571
 38. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav*. 2008;94(2):206-218. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.010.

39. Tchkonina T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, et al. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2005;288(1):51-1). doi:10.1152/ajpendo.00265.2004
40. de Queiroz JCF, Alonso-Vale MIC, Curi R, Lima FB. Control of adipogenesis by fatty acids. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(5):582-594.
41. Rosenbaum M, Leibel RL. Role of leptin in energy homeostasis in humans. *J Endocrinol.* 2014;223(1):T83-T96. doi:10.1530/JOE-14-0358 doi:10.1590/s0004-27302009000500011
42. Pettitt DJ, Knowler WC. Diabetes and obesity in the Pima Indians: a crossgenerational vicious cycle. *J Obesity Weight Regul* 1988;7:61–65
43. Dabelea D, Hanson RL, Bennett PH, Roumain J, Knowler WC, Pettitt DJ. Increasing prevalence of type II diabetes in American Indian children. *Diabetologia* 1998;41:904–910
44. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, et al. High prevalence of type 2 diabetes and pre-diabetes in adult offspring of women with gestational Diabetes mellitus or type 1 diabetes: the role of intrauterine hyperglycemia. *Diabetes Care* 2008;31:340–346
45. Bouchard C. Childhood obesity: Are genetic differences involved? In: *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 89. Am J Clin Nutr; 2009. doi:10.3945/ajcn.2009.27113C
46. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *Lancet.* 2011;378(9793):804-814. doi:10.1016/S0140-6736(11)60813-1
47. Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nat Metab.* 2019;1(2):189-200. doi:10.1038/s42255-018-0021-8
48. Dabelea D, Crume T. Maternal environment and the transgenerational cycle of obesity and diabetes. *Diabetes* 2011; 60:1849-1855, 2011.
49. Heding LG, Persson B, Stangenberg M. B-cell function in newborn infants of diabetic mothers. *Diabetologia* 1980;19:427–432.

50. Guyton A, Hall J. *Fisiologia Médica*. Vol 37.; 2006.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9550589>
51. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715-736. doi:10.1146/annurev-biochem-052110-115718



UNESP



FACULDADE DE MEDICINA
FMB
1943
BOTUCATU

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE BOTUCATU
FACULDADE DE MEDICINA

Comissão de Ética no Uso de Animais

Criada através da Portaria DFM nº 611 de 13/12/2012

CERTIFICADO Nº 1335/2019 – CEUA

Certificamos que o projeto intitulado: **"Repercussões no tecido adiposo periovariano após exposição à hiperglicemia materna e dieta hiperlipídica após desmame de ratas."**, conduzido pela Pesquisadora: **Carolina Magrin Saullo** – Orientadora: Profa. Dra. Débora Cristina Damasceno – Coorientador: Profa. Dra. Yuri Karen Sinzato e Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato, registrada com o nº **1335/2019**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADA pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Botucatu, em reunião extraordinária de 29 de janeiro de 2020.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	02 de janeiro de 2022	
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo Isogênico	
Nº de animais	ZERO	
Idade/Peso	120 dias – 250 gramas	
Origem	Biotério	



Sara Rosa Stanley Sampaio
Profª. Associada Bertha Furlan Polegato
Secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP



Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina de Botucatu/UNESP

Distrito Rubião Júnior, s/nº – Botucatu – S.P. CEP: 18.618-970 Fones: (14) 3880.18.80 – E-mail Secretária: ceua@fmb.unesp.br

PROSPERO**International prospective register of systematic reviews**[< Back](#)

Dear Miss Saullo,

Thank you for submitting details of your systematic review protocol "Effects of maternal high-fat diet on adipose tissue and inflammatory processes in rodents: A systematic review" to PROSPERO. We are pleased to confirm that your protocol will be published in the register within the next hour.

Your registration number is: CRD42020191457

You are free to update the record at any time, all submitted changes will be displayed as the latest version, with previous versions available to public view. Please also give brief details of the key changes in the Revision notes facility. You can log in to PROSPERO and access your records at <https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO>

Comments and feedback on your experience of registering with PROSPERO are welcome at: crd-register@york.ac.uk

Best wishes for the successful completion of your review.

Yours sincerely,
Julia Menon
PROSPERO Administrator
e: CRD-register-2@york.ac.uk

PROSPERO is funded by the National Institute for Health Research and produced by CRD, which is an academic department of the University of York.

Email disclaimer: <https://www.york.ac.uk/docs/disclaimer/email.htm>

PROSPERO

Article type: Original Article

Maternal high-fat diet on adipose tissue in murine offspring: A systematic review and meta-analysis

Carolina Saullo¹, Débora Damasceno¹, Gustavo Volpato², Yuri Sinzato¹, Barshana Karki^{1,3},
Giovana Vesentini^{1*}

¹Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Postgraduate Course on Tocogynecology, Botucatu Medical School, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Sao Paulo State, Brazil.

²Laboratory of System Physiology and Reproductive Toxicology, Institute of Biological and Health Sciences, Federal University of Mato Grosso (UFMT), Barra do Garças, Mato Grosso State, Brazil.

³Boston, Massachusetts, United States.

*Corresponding author: Giovana Vesentini Ph.D., Address: Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia – UNIPLEX, Faculdade de Medicina de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/s, 18610879, Brasil; E-mail: giovana.vesentini@unesp.br

Keywords: Hyperlipidic diet, rats, pups, adipose tissue, systematic review.

Running title: High-fat diet and offspring repercussions

Contact info: Giovana Vesentini Ph.D., Address: Laboratório de Pesquisa Experimental em Ginecologia e Obstetrícia – UNIPLEX, Faculdade de Medicina de Botucatu, Distrito de Rubião Júnior s/n, 18610879, Brasil; E-mail: giovana.vesentini@unesp.br

Word count: 3964

Acknowledgment

The authors thank the students of the research team of the Experimental Research Laboratory on Gynecology and Obstetrics at the Botucatu Medical School - Unesp.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Importance of this study**What is already known?**

- When obesity is linked to the gestational period, it generates an obesogenic intrauterine environment, which then negatively influences the development of tissues and cells of the offspring.
- Possible changes induced during intrauterine environment might lead to onset of diseases at adulthood, including abnormal fat accumulation in adipose tissue.

What does this review add?

- The current review shows that hypertrophic obesity is related to the influence of intrauterine obesogenic environment and a post-natal high-fat diet consumption of offspring.
- Hyperplasia of adipose tissue is exclusively related to the high-fat diet consumption, and is not influenced by the intrauterine environment. Furthermore, hypertrophy onset occurs in different regions of body tissue and is related to the sex of the pups.

How might your results change the direction of research or the focus of clinical practice?

- The obesogenic intrauterine environment contributes to hypertrophic obesity in the offspring, which is related to the appearance of other comorbidities.
- The descendants need to be careful about excessive consumption of western-style diet, as well as the search for strategies to prevent lipogenesis process stimulation, hence avoiding adipocyte hypertrophy.

Abstract

Objective: Obesity is considered a worldwide public health problem, and affects a high number of women of childbearing age. It is known that nutritional changes during pre-gestational, gestational and lactation period results in long-term prognosis on the offspring. Thus, this review aims at analyzing the influence of maternal high-fat diet (HFD) on the morphology of the offspring adipocytes (visceral and subcutaneous white adipose tissue).

Methods: The search was conducted in Pubmed, EMBASE and Web of Science databases up to August 2020. The outcomes were extracted and pooled as standardized mean difference with random effect models.

Results: 4,649 articles were found in the databases. Of these, only 28 were selected to compose this systematic review and 15 were included in the meta-analysis. A large discrepancy on the percentage of fat that compose the high-fat diet (from 14% to 62%) was observed.

Conclusion: The chronic consumption of a maternal HFD influences the development of the visceral white adipose tissue of their offspring related to adipocyte hypertrophy, regardless of the HFD or control diet consumption. The offspring fed HFD at long-term presented hyperplasia. Furthermore, the adipocyte hypertrophy in the different regions of the adipose tissue is related to the sex of the pups.

Introduction

Obesity has been considered a global public health problem for years,¹ affects approximately 650 million adults worldwide, and is related to the appearance of other comorbidities, such as cardiovascular, musculoskeletal diseases and cancer,² which produce a great social and economic impact.^{3,4}

By definition, obesity is the increase in white adipose tissue (WAT) and can alter the WAT function, which predisposes individuals to present metabolic problems.⁵ The WAT stores triglycerides in a single lipid drop as energy, presents mechanical and thermal protection. It is found in the visceral or subcutaneous regions⁶ with cellular specificity in each region, is more prone to hyperplasia (increase in the cell number) in the subcutaneous region and hypertrophy (increase in the cell area/volume) in the visceral region.⁷ Genetic factors associated with environmental factors,⁸ like lifestyle and high-fat diet consumption, especially in the current Western food pattern, cause a larger adipose tissue.⁹ An imbalance between caloric consumption and energy expenditure has been verified, and the excess energy is processed and stored in adipose tissue in the form of triglycerides by a process called lipogenesis.¹⁰

WAT is the main energy storage tissue and considered as an endocrine organ. The fat accumulation or expansion of this tissue is related to hyperplasia or hypertrophy of adipocytes.¹¹ Adipocyte hypertrophy causes a hypoperfused tissue with areas of microhypoxia and activates the gene expression of inflammation markers.^{12,13}

In addition, obesity-induced metabolic disorders vary according to the individual gender and hormonal regulation, which influence the body fat distribution.¹⁴ The increased prevalence of obesity affects a high number of women of childbearing age and pregnant women.² Nutritional changes in the pre-gestational, gestational and lactation periods interfere with fetal programming, leading to health or diseases in these offspring at long-term,¹⁵ as evidenced by

“Developmental Origin of Health and Disease (DOHaD)” theory. Clinical studies have showed maternal obesity might increase a propensity of children with obesity in adulthood.¹⁶ Thus, maternal obesity increases the storage capacity of triglycerides by adipocytes, especially in the WAT of the offspring, leading to cellular hypertrophy.¹⁷ In order to improve understanding of the maternal consumption of high-fat diet (HFD), obesity onset, WAT accumulation, fetal programming, metabolic pathways, considering that fat deposits in murines and humans are highly analogous (morphology and physiology)¹⁸ and analyzing the bias and ethical factors of clinical studies, investigations in laboratory animals are necessary. Thus, this present systematic review aims at analyzing the influence of the maternal hyperlipidic diet on the morphology (area, diameter and number) of adipocytes in the visceral and subcutaneous white adipose tissue of murine offspring and to evaluate the sex influence of these offspring on the analyzed parameters.

Methods

A. Search strategy

This study followed the PRISMA guideline recommendations (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses).¹⁹ The protocol for this systematic review was previously registered on the PROSPERO platform (International Prospective Register of Systematic Reviews) under protocol number CRD42020191457. The search strategy was performed on August 18, 2020 in the databases Pubmed (Public/ Publisher MEDLINE), EMBASE (Excerpta Medica Database) and Web of Science. The full search strategy used in each database is in Appendix 1 as Supplementary Material.

English studies were used without restriction of year and entirely published in scientific journals that went through the peer-review process. The articles were classified by two independent

researchers (CS and GV) and the studies for each database were exported to the EndNote X9 database. Duplicates were identified and deleted. Subsequently, the studies were imported into the Rayyan online program, in which the reviewers evaluated the titles and abstracts. Then, potentially eligible articles were selected for full-text analysis. In the presence of discrepancies between the reviewers, a discussion was held between CS and GV and, in case of a disagreement, a third researcher (DCD) was appointed to help make the final decision.

B. Eligibility Criteria

Animals / Population

In vivo studies using mice and rats were included. However, articles that used in vitro tests, human studies, animals that were not rodents, spontaneously obese or genetically modified rodents were not included.

Intervention

The selected articles used offsprings from an inappropriate intrauterine environment due to maternal consumption of a high-fat diet, in one or more associated periods (before pregnancy, during pregnancy, during lactation and/or postnatal phase), as well as ingestion of HFD or control diet by offspring. Articles published with methodologies that used diets with a high content of sucrose or fructose, i.e., larger than the control diet, with lower fat content, hypoproteins and/or with a decrease in any other nutrients were excluded. Research involving paternal interventions was also excluded.

Comparison

The offspring of an unfavorable intrauterine environment with the aforementioned interventions were compared with animals that came from an unchanged intrauterine environment and received only a control diet (i.e., standard diet). Studies that did not present with the group that fed a control diet were excluded.

Outcomes

All articles published with data of morphometry (area and / or diameter) of adipocytes of the visceral region (constituted by the perirenal, gonadal, perigonadal, mesenteric, retroperitoneal and omental regions) and the subcutaneous region (subscapular or inguinal) of the white adipose tissue of murines were included. The secondary outcome was dietary intake presented in terms of the amount of feed and energy consumed.

C. Data extraction

The relevant information in the articles was extracted by two independent researchers (CS and GV) and were cataloged in a standardized database in the Excel program (Microsoft Office®). The following data were extracted from the selected articles for this review: authors; year; macronutrient composition of the high-fat diet; source of fat from the high-fat diet; macronutrient composition of the control diet; animals used; time of ingestion of the high fat diet by the mother and offspring; sample size of all groups; number of study groups; sex of descendants, mean and standard deviation (or standard error of the mean) of the outcomes of interest assessed (region with the most altered adipocytes) and unit of measurement used (micrometer or square micrometer, respectively, μm or μm^2).

D. Bias Risk Assessment

The articles selected were assessed for the risk of bias by two investigators (CS and GV) using the Systematic Review Center for Laboratory Animal Experimentation (SYRCLE) Risk of Bias tool. The SYRCLE tool is composed of 10 items related to selection, performance, friction detection, disclosure and other biases. For each assessment item, the risk was classified as high, low or uncertain according to the information provided by the studies.²⁰ In the case of discrepancies between the researchers, a third researcher (DCD) was called in to resolve the

conflict.

Statistical analysis

When two or more studies reported information on sample size, mean and standard deviation (SD) or standard error of mean (SEM), they were included in the meta-analysis. Studies that presented their results in a descriptive manner using another unit of measurement – other than micrometers or micrometers squared - or without reporting the precise values of the sample size were excluded from the meta-analysis. The results were analyzed according to the region of collection and type of diet of the offspring. The outcomes analyzed in the same collection regions as mesenteric, perirenal, perigonadal, retroperitoneal and omental adipose tissue were grouped and termed as visceral region. The subscapular and inguinal regions were grouped and named as the subcutaneous region. Since these are continuous data without standardization as to the form of morphometric analysis of the studies, the standardized mean difference was calculated using the random effects model together with the confidence interval. $P < 0.05$ was considered as a limit of statistical significance. The calculation of heterogeneity between the studies was performed by I^2 , which is calculated by the sample size, the means, standard deviations or standard errors of the mean to determine the heterogeneity between the studies included in each outcome of the meta-analysis. I^2 cutoff values were considered to be $<40\%$ low, 30-60% moderate, 50-90% substantial and $>75\%$ high.²¹ To assess heterogeneity between studies, the P-value <0.10 was considered as statistically significant. For all statistical and graphical tests, the Review Manager software (version 5.3) was used.

Results

Figure 1 illustrates the flowchart of selected articles for systematic review. 4,649 articles were initially found in the databases using the mentioned keywords. Of these, 939 were removed

because of the duplicate, reaching 3,710 articles to be evaluated by title followed by summary analysis and 285 were selected to be read in full and to compose the systematic review. After reading the full articles, 257 were excluded (113 due to type of publication, 34 for the intervention performed, 1 for the comparison of the groups studied, 17 for the population analyzed and 92 for not including the outcomes evaluated in this review). Thus, 28 articles²²⁻⁴⁹ were included in this review and, of these, 15^{23-27,29,31,32,39,40,43,45,46,48,49} in the meta-analysis (Figure 1).

Characteristics of included studies

61% of the studies were performed in mice and 39% in rats (Figure 2A). The main strains used in the studies were: Wistar rats (7 studies)^{22,23,25,30,31,38,39}, Sprague-Dawley (3 studies)^{40,42,43} and Long-Evans (1 study)⁴⁷ and mice C57BL/6 (6 studies)^{28,29,32,36,45,46}, C57BL (1 study)³³, C57BL/6J (8 studies)^{24,26,27,35,41,44,48,49}, C57BL/6N (2 studies)^{34,37}. The main lipid component of the diets was lard mixed with vegetable soy oil (Figure 2B) to facilitate its handling. The distribution of macronutrients in the high-fat diet, that is, the percentage of carbohydrates, lipids and proteins that make up the diet, extensively varied in the amount of fat between the studies, with a minimum of 14%⁴⁴ and a maximum of 62%⁴⁸. There was also a variation in the period of consumption of the high-fat diet by mothers, ranging from 20 days (mothers consumed HFD only during the lactation period)^{25,32,44} to approximately 160 days (HFD consumption is extended around 112 days in the pre-pregnancy period, 20 days in the pregnancy and another 20 days in the lactation) (Figure 2C)³¹. Regarding the HFD consumption in the pre-pregnancy period, there was a variation of 10²⁹ to 112 days³¹. HFD consumption by offspring also ranged from 0^{22,23,25,28,29,31-37,40,45} to 270 days (Figure 2D)²⁷. Of the 28 studies included, 12 presented the analysis of visceral and subcutaneous adipose tissue as an outcome^{22-26,32,33,42,43,45,46,49}, while 14 chose to analyze only visceral fat^{27-31,34,36,38-41,44,47,48} and 2 studies only subcutaneous

adipose tissue^{35,37}. (Table 1)

Main outcomes analysis

There was an increased area of adipocytes in the visceral adipose tissue of offspring who consumed HFD from mothers also consumed HFD [SMD 2.77 (1.42 - 4.12; $P < 0.0001$; $I^2 = 73\%$)]^{24-27,39,48}. The same was found in the offspring who consumed the control diet from mothers who consumed HFD [SMD 0.75 (0.43 - 1.06; $p < 0.00001$; $I^2 = 0\%$)]^{23,25,26,29,31,39,40,45,48} when compared to the control group (mothers who consumed the control diet). As for the diameter of the adipocytes in the regions of the visceral adipose tissue, an increase was found only in the groups whose mothers and offspring consumed HFD [SMD 2.52 (0.45 - 4.58; $P = 0.02$; $I^2 = 81\%$)]^{24,32,49}. No significant difference was found in the diameter of the adipocytes of offspring who consumed a control diet from mothers who consumed HFD [SMD 0.66 (-2.58 - 3.90; $P = 0.69$; $I^2 = 93\%$)]^{32,36}(Figure 3).

No difference was found in the area of adipocytes in the subcutaneous region of offspring who consumed HFD from mothers who also consumed HFD [SMD 1.42 (-0.27 - 3.12; $P = 0.10$)] (Supplementary Material - Appendix 2)²⁵. The area of the adipocytes of the subcutaneous adipose tissue of the offspring who consumed a control diet from mothers who consumed HFD [SMD 0.25 (-0.32 - 0.83; $P = 0.39$; $I^2 = 2\%$)]^{22,25,45} did not differ from the diameter of the adipocytes of the subcutaneous adipose tissue of offspring who consumed HFD from mothers who also consumed HFD [SMD 0.87 (-7.84 - 9.58; $p = 0.85$; $I^2 = 96\%$)]^{32,49} (Figure 3).

There was an increased number of adipocytes in the visceral region in offspring who consumed HFD from mothers who also consumed HFD [SMD 1.04 (0.29-1.80; $p = 0.007$; $I^2 = 14\%$)]^{25,32,41,42}. However, there was no difference in the offspring who consumed a control diet [SMD 0.13 (-0.35 - 0.62; $p = 0.59$; $I^2 = 35\%$)]^{25,31,32,41-43} from mothers who consumed HFD. In the subcutaneous region, no significant differences were found in the number of adipocytes,

regardless of whether the diet consumed by the offspring was HFD [SMD 0.02 (-0.67 - 0.72; $p = 0.95$; $I^2 = 0\%$)]^{25,32,42} or control [SMD 0.12 (-0.72 - 0.96; $p = 0.79$; $I^2 = 55\%$)]^{25,32,42} (Figure 4).

When analyzing the results according to the sex of the pups, significant differences were found in both; area [SMD 2.61 (1.47 - 6.91; $p < 0.00001$; $I^2 = 1\%$)]^{24,27,48} and in the diameter [SMD 1, 36 (0.31 - 2.14; $p = 0.01$; $I^2 = \text{NA}$)]²⁴ of the adipocytes in the visceral region of female offspring who consumed HFD from mothers who also consumed this diet. The same was found for male offspring who consumed HFD in relation to the area of adipocytes in the visceral region [SMD 1.25 (0.19 - 2.32; $p = 0.02$; $I^2 = 24\%$)]^{25,39,48}. However, there was no significant difference in diameter [SMD 4.12 (-0.61 - 8.85; $p = 0.09$; $I^2 = 85\%$)]^{32,49} and number [SMD 0.68 (-0.23 - 1.58; $p = 0.14$; $I^2 = 12\%$)]^{32,42} of these adipocytes. Male offspring who consumed a control diet from mothers who consumed HFD showed a significant difference in the area of adipocytes in the visceral region [SMD 0.59 (0.14 - 1.04; $p = 0.01$; $I^2 = 0\%$)]^{23,25,31,39,40,45,48}. In the subcutaneous region, female offspring who consumed a control diet from mothers who consumed HFD showed a significant difference in the area of adipocytes [SMD 4.21 (1.54 - 6.89; $p = 0.002$; $I^2 = \text{NA}$)]²³. In the adipocytes of male offspring who consumed HFD from mothers with HFD, a significant difference was found only in the diameter [SMD 4.08 (2.37 - 5.79; $p < 0.00001$; $I^2 = 19\%$)]^{32,49} (Table 2).

Regarding the number of adipocytes, there was no significant difference in both sexes of offspring who consumed a control diet (Table 2).

A significant difference was found in the energy consumption of offspring who consumed HFD from mothers who also consumed HFD [SMD 1.61 (0.63 - 2.60; $p = 0.001$; $I^2 = 75\%$)]^{28,32,44,48,49}, which did not occur in the offspring who consumed the control diet [SMD -0.13 (-0.69 - 0.44; $p = 0.66$; $I^2 = 64\%$)]^{28,32,36,44,45,48}. The consumption of food consumed (in grams) was also analyzed and no significant differences were found, regardless of whether the

offspring's consumption was HFD [SMD 0.21 (-1.03 - 1.46; $p = 0.74$)]²⁸ or control diet [SMD 0.80 (-0.18- 1.78; $p = 0.11$; $I^2 = 72\%$)]^{28,36,47} (Figure 5).

Risk of bias

The analysis of the risk of bias was high in 16 studies in the item sequencing of the groups. As for the item of basic characteristics of the experimental groups, the risk of bias was low in 19 studies. Considering the blinding of animal allocation, location of cages, blinding of animal caretakers and randomization of results, the data provided by the studies were insufficient, resulting in a risk of uncertain bias in all studies included. The blinding of the evaluator regarding the results presented a low risk of bias in only three studies out of the 28 evaluated. In the item “incomplete results”, only seven studies were at low risk of bias, the others did not provide enough information. Regarding the study design, a low risk of bias was found for all 28 included studies and as for the other biases, 25 had a low risk of bias while six did not provide enough information to analyze this item (Figure 6 and Supplementary Material - Appendix 3).

Discussion

Main findings

In this present study, a disparity in the fat percentage that composes high-fat diet (HFD) varied from 14% to 62%. Additionally, the day number and period (pregnancy, pregnancy and lactation or lactation) of maternal HFD consumption differed among the studies. As an outcome, the offspring from mothers who consumed HFD and were given a HFD or a control diet showed hypertrophy of the adipocyte area of the visceral white adipose tissue (WAT). Similarly, a greater diameter of these adipocytes when the offspring also consumed a HFD was

verified. The offspring showed no difference in the area and diameter of adipocytes of the subcutaneous WAT regardless of the type of diet consumed. Considering the number of adipocytes, a hyperplasia was observed in the visceral region only in offspring given a HFD. In the subcutaneous region, no cellular hyperplasia, regardless of the HFD or control consumption by pups, was observed.

HFD consumption caused hypertrophy (greater area or diameter) of adipocytes in the visceral region in both sexes of the offspring; however, HFD caused no cellular hyperplasia. For offspring who consumed a control diet, the hypertrophy of adipocytes was observed in the visceral region of male pups and in the subcutaneous region of female pups.

In addition, the pups fed with HFD had a higher caloric intake, but the amount of feed consumed was not changed. For the analysis of the risks of bias in the studies of this review, in six items out of the 10 existing, the information contained in the studies was insufficient to classify the bias. In 11 of the 28 studies, the risk of bias about group randomization was high. The study design had a low risk of bias in all studies included in this review, as well as other biases, in which 27 studies had a low risk of bias.

Implications

Adipocytes are important cells for metabolism homeostasis due to their ability to store energy in the form of triglycerides.⁵¹ Thus, changes in adipose tissue lead to several pathological effects, such as insulin resistance and high levels of free circulating fatty acids, which induces a chronic inflammatory condition by the synthesis and secretion of proinflammatory adipokines, including leptin through abnormal metabolic homeostasis.⁵²

As the body needs to store triglycerides, the hypertrophy process is stimulated even in the subcutaneous adipose tissue.²² In addition; the maternal HFD consumption stimulates the enzymes (lipoprotein lipases) that activate the lipogenesis process in the offspring, which induces the process of adipocyte hypertrophy and reduces the activating factors of adipogenesis.

This declines the process of cell differentiation of adipocytes and prevents the adipocyte hyperplasia.⁵³

During the perinatal period, the maternal nutritional imbalance is an important factor in the programming of the obesity development and other comorbidities of adult offspring⁵⁴ due to the existence of a critical window of fetal programming.⁵⁵ This is explained due to different moments of exposure to an obesogenic environment can change the phenotype of the offspring related to cell or tissue alterations, depending on the organs that are developing at the time of the dietary intervention.⁵⁶ Maternal insults, like HFD consumption,³² during adipose tissue fetal development will determine the vulnerability window to possible future environmental aggressions. In rodents, adipogenesis (transformation of pre-adipocytes into mature adipocytes) is activated during the perinatal period, especially in the last week of pregnancy and is accelerated from the beginning of postnatal life until weaning.⁵⁷ In humans, this process occurs before birth.⁵⁸ Nutritional changes in mothers during lactation and in their offspring effect the adiposity in the adult offspring,⁵⁹ which is related to the WAT greater sensitivity in the lactation period. In humans, the proportion of the WAT doubles from 10% (at birth) to 20% (around six weeks of life),⁶⁰ being even more prominent in rodents, which have insignificant fat deposits at birth.

Moreover, the time of development, the characteristics of the type of adipose tissue are relevant due to their susceptibility to metabolic diseases. Subcutaneous adipocytes are associated with protective metabolic effects.¹⁸ On the other hand, visceral deposit, such as gonadal, perirenal, retroperitoneal, mesenteric, omental and pericardial fats in rodents, are commonly associated with metabolic disorders, like Type 2 *Diabetes mellitus*.⁶¹ This functional difference can be explained by the distinct ability of adipogenesis and replication of pre-adipocytes,⁷ as mature but not hypertrophied adipocytes, synthesize and secrete anti-inflammatory adipokines, while hypertrophied adipocytes secrete large amounts of proinflammatory cytokines.⁶² In

physiological conditions, there must be a balance between adipocyte hyperplasia and hypertrophy. When a mother consumes HFD, the adipocyte hyperplasia of the offspring occurs and stimulates the lipogenesis signaling cascade, thus stimulating adipocyte hypertrophy.⁶³ However, in the case of hypertrophic obesity, there is infiltration of macrophages, which impairs the adipogenesis process.⁶⁴

In this review, the offspring from mothers who consumed HFD showed hypertrophy of adipocytes in visceral WAT, making them more susceptible to the comorbidities. Regarding the sex of the offspring, the difference in adipocyte hypertrophy in the regions of the WAT is related to alpha and beta estrogen receptors of the adipose cells of the female offspring, which have metabolic anti-lipogenic effects and promote a reduction in body weight.⁶⁵ However, maternal HFD consumption may reduce these receptors in the visceral and subcutaneous adipose tissues of female offspring, stimulating lipogenesis and body weight gain.

The adipose tissue physiology in the subcutaneous region is more prone to developing hyperplasia due to the prevalence of factors related to the adipogenesis process, while in the visceral region is more prone to the cellular hypertrophy.⁶⁶ This explains our review related to the hypertrophy in the adipocyte visceral regions, confirmed by the expansion of area and diameter of these adipocytes of offspring from mothers who consumed DHL. However, there was no hypertrophy in the adipocytes of the subcutaneous regions of these pups. Therefore, we conclude that adipose tissue is not a homogeneous organ, being composed of effectively distinct cell subtypes.¹⁸ The essential mechanisms, combined with local variation in cell composition, are probably responsible for regional differences in the size and function of adipose tissue.

Strengths and limitations

One of the causal factors of visceral adipocyte hypertrophy is the chronic consumption of HFD, however this review showed no standard for a diet to be considered hyperlipidic. We found a high variation for fat (from 14% to 62%) in the composition of the high fat diet, which is

considered a limiting factor. For humans, the maximum value for macronutrient consumption varies according to the guideline for the recommendation of maximum daily lipid consumption. According to the Recommended Dietary Allowances, the maximum consumption value is 30% of the total daily caloric intake.⁶⁷ Therefore; it would be interesting to establish a standard to be followed in relation to the type of food intervention, aiming to mimic the amount of fat consumed in human diets, especially from West.

When analyzing the risks of bias, there is not enough information about the conduct of the experiments, blindness of the researchers, how the randomization of the studied groups was carried out and other details that interfere in the replication of the study and in the reliability of the results. Besides, the form of presentation of the results, with different units of measurement is relevant because shows a disadvantage for the accomplishment of the meta-analysis.

The consumption of Western diet (high in fat and calories) is high, and then to transpose experimental animal research into clinical practice to understand the influence of transgenerational obesity on the adipocyte physiology of offspring exposed to an inappropriate intrauterine environment is imperative. This might prevent future comorbidities related to fatty tissue changes of these individuals for a better quality of life moving forward.

Conclusion

Thus, the maternal chronic consumption of high-fat diet influences development of the visceral white adipose tissue (morphology, area, diameter and number of adipocytes) of their offspring, especially when the pups maintain the high-fat diet consumption in postnatal life. However, with the consumption of a control diet by the offspring, a difference between adipocyte hypertrophy in relation to the region of adipose tissue and the sex of the offspring, occurring hypertrophy in the visceral region of males and in the subcutaneous region of females, was observed.

Acknowledgements

The authors thank the students of the Laboratory of Experimental Research on Gynecology and Obstetrics, Botucatu Medical School, Unesp.

References

1. Popkin BM, Adair LS, Ng SW. Global nutrition transition and the pandemic of obesity in developing countries. *Nutr Rev*. 2012;70(1):3-21.
2. Obesity and overweight. Accessed January 7, 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
3. Meera Shekar BP. *Challenge, Obesity: Health and Economic Consequences of an Impending Global Human Development Perspectives*. World Bank Publications; 2020.
4. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation - PubMed. Accessed January 13, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11234459/>
5. Sun K, Kusminski CM, Scherer PE. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*. 2011;121(6):2094-2101.
6. Ahima RS, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends Endocrinol Metab*. 2000;11(8):327-332.
7. Gesta S, Blüher M, Yamamoto Y, et al. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(17):6676-6681.
8. Bouchard C. Childhood obesity: Are genetic differences involved? In: *American Journal of Clinical Nutrition*. Vol 89. Am J Clin Nutr; 2009.
9. Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, et al. The global obesity pandemic: Shaped by global drivers and local environments. *Lancet*. 2011;378(9793):804-814.
10. Chouchani ET, Kajimura S. Metabolic adaptation and maladaptation in adipose tissue. *Nat Metab*. 2019;1(2):189-200.
11. Björntorp P, Sjöström L. Number and size of adipose tissue fat cells in relation to metabolism in human obesity. *Metabolism*. 1971;20(7):703-713.
12. Schenk S, Saberi M, Olefsky JM. Insulin sensitivity: Modulation by nutrients and inflammation. *J Clin Invest*. 2008;118(9):2992-3002.

13. Al-Suhaimi EA, Shehzad A. Leptin, resistin and visfatin: The missing link between endocrine metabolic disorders and immunity. *Eur J Med Res*. 2013;18(1).
14. Rosenbaum M, Leibel RL. Role of leptin in energy homeostasis in humans. *J Endocrinol*. 2014;223(1):T83-T96.
15. Gluckman PD, Hanson MA, Beedle AS. Early life events and their consequences for later disease: A life history and evolutionary perspective. *Am J Hum Biol*. 2007;19(1):1-19.
16. The impact of maternal obesity on maternal and fetal health - PubMed. Accessed January 7, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19173021/>
17. Lukaszewski MA, Eberlé D, Vieau D, Breton C. Nutritional manipulations in the perinatal period program adipose tissue in offspring. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2013;305(10).
18. Tchkonina T, Thomou T, Zhu Y, et al. Mechanisms and metabolic implications of regional differences among fat depots. *Cell Metab*. 2013;17(5):644-656.
19. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*. 2009;339.
20. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol*. 2014;14(1):43.
21. Higgins JPT TJ, Chandler J, Cumpston M, Li T, Page MJ, Welch VA (editors). *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*. 2nd Edition. Chichester (UK): John Wiley & Sons. 2019.
22. Almeida MM, Dias-Rocha CP, Souza AS, 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. *Br J Nutr*. 2017;118(10):788-803.
23. de Almeida MM, Dias-Rocha CP, Reis-Gomes CF, et al. Maternal high-fat diet up-regulates type-1 cannabinoid receptor with estrogen signaling changes in a sex- and depot- specific manner in white adipose tissue of adult rat offspring. *Eur J Nutr*. Published online 2020.
24. Bibi S, Kang Y, Du M, Zhu M. susceptibility to DSS-induced colitis in mice.

- 2019;25(5):901-908.
25. Butruille L, Marouze L, Pourpe C, et al. Maternal high-fat diet during suckling programs visceral adiposity and epigenetic regulation of adipose tissue stearoyl-CoA desaturase-1 in offspring. *Int J Obes*. 2019;43(12):2381-2393.
 26. Chang E, Hafner H, Varghese M, et al. Programming effects of maternal and gestational obesity on offspring metabolism and metabolic inflammation. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-15.
 27. Ding Y, Li J, Liu S, et al. DNA hypomethylation of inflammation-associated genes in adipose tissue of female mice after multigenerational high fat diet feeding. *Int J Obes*. 2014;38(2):198-204.
 28. Gregorio BM, Souza-Mello V, Mandarim-De-Lacerda CA, Aguila MB. Maternal high-fat diet is associated with altered pancreatic remodelling in mice offspring. *Eur J Nutr*. 2013;52(2):759-769.
 29. Jiao F, Yan X, Yu Y, et al. Protective effects of maternal methyl donor supplementation on adult offspring of high fat diet-fed dams. *J Nutr Biochem*. 2016;34:42-51.
 30. Kruse M, Seki Y, Vuguin PM, et al. High-fat intake during pregnancy and lactation exacerbates high-fat diet-induced complications in male offspring in mice. *Endocrinology*. 2013;154(10):3565-3576.
 31. Lecoutre S, Deracinois B, Laborie C, et al. Depot- and sex-specific effects of maternal obesity in offspring's adipose tissue. *J Endocrinol*. 2016;230(1):39-53.
 32. Liang X, Yang Q, Fu X, et al. Maternal obesity epigenetically alters visceral fat progenitor cell properties in male offspring mice. *J Physiol*. 2016;594(15):4453-4466.
 33. Liang X, Yang Q, Zhang L, et al. Maternal high-fat diet during lactation impairs thermogenic function of brown adipose tissue in offspring mice. *Sci Rep*. 2016;6(May):1-12.
 34. Litzenburger T, Huber EK, Dinger K, et al. Maternal high-fat diet induces long-term obesity with sex-dependent metabolic programming of adipocyte differentiation, hypertrophy and dysfunction in the offspring. *Clin Sci*. 2020;134(7):921-939.
 35. Liu F, Zhang G, Sheng X, et al. Effects of hereditary moderate high fat diet on metabolic performance and physical endurance capacity in C57BL/6 offspring. *Mol*

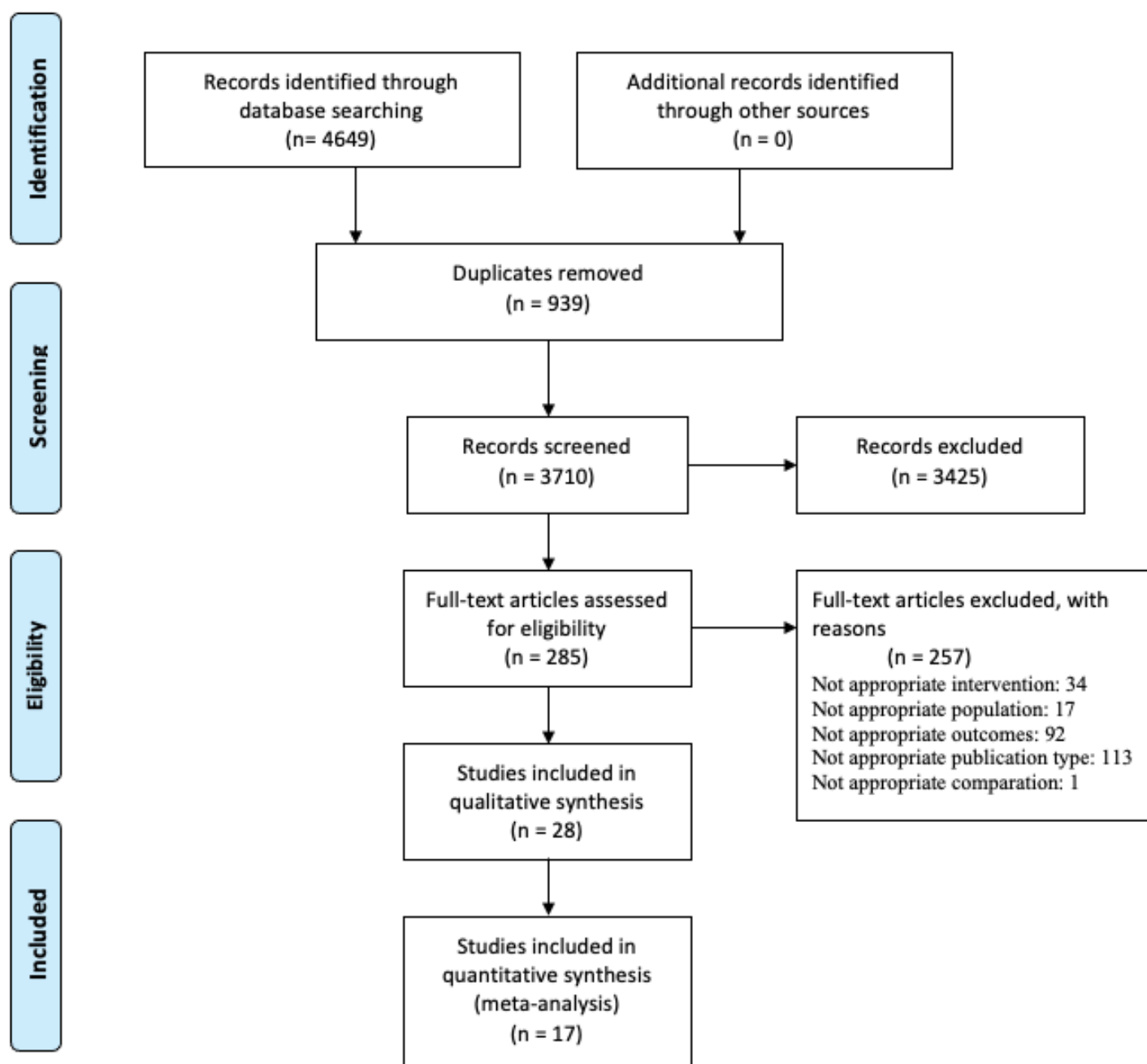
- Med Rep.* 2018;17(3):4672-4680.
36. Magliano DC, Bargut TCL, de Carvalho SN, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Souza-Mello V. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors-Alpha and Gamma Are Targets to Treat Offspring from Maternal Diet-Induced Obesity in Mice. *PLoS One.* 2013;8(5).
 37. Murabayashi N, Sugiyama T, Zhang L, et al. Maternal high-fat diets cause insulin resistance through inflammatory changes in fetal adipose tissue. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2013;169(1):39-44.
 38. Parente LB, Aguila MB, Mandarim-de-Lacerda CA. Deleterious effects of high-fat diet on perinatal and postweaning periods in adult rat offspring. *Clin Nutr.* 2008;27(4):623-634.
 39. dos Santos LS, de Matos RJB, Cordeiro G dos S, et al. Perinatal and post-weaning exposure to an obesogenic diet promotes greater expression of nuclear factor- κ B and tumor necrosis factor- α in white adipose tissue and hypothalamus of adult rats. *Nutr Neurosci.* 2020;0(0):1-9.
 40. Segovia SA, Vickers MH, Harrison CJ, Patel R, Gray C, Reynolds CM. Maternal High-Fat and High-Salt Diets Have Differential Programming Effects on Metabolism in Adult Male Rat Offspring. *Front Nutr.* 2018;5(March):1-13.
 41. Sellayah D, Thomas H, Lanham SA, Cagampang FR. Maternal obesity during pregnancy and lactation influences offspring obesogenic adipogenesis but not developmental adipogenesis in mice. *Nutrients.* 2019;11(3).
 42. Šnajder D, Perić Kačarević Ž, Grgić A, et al. Effect of different combination of maternal and postnatal diet on adipose tissue morphology in male rat offspring. *J Matern Neonatal Med.* 2019;32(11):1838-1846.
 43. Tsai TA, Tsai CK, Huang LT, et al. Maternal resveratrol treatment re-programs and maternal high-fat diet-induced retroperitoneal adiposity in male offspring. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(8).
 44. Tsuduki T, Yamamoto K, Shuang E, Hatakeyama Y, Sakamoto Y. High dietary fat intake during lactation promotes the development of social stress-induced obesity in the offspring of mice. *Nutrients.* 2015;7(7):5916-5932.
 45. Umekawa T, Sugiyama T, Du Q, et al. A maternal mouse diet with moderately high-fat

- levels does not lead to maternal obesity but causes mesenteric adipose tissue dysfunction in male offspring. *J Nutr Biochem*. 2015;26(3):259-266.
46. Volpato AM, Schultz A, Magalhães-Da-Costa E, Correia MLDG, Águila MB, Mandarin-De-Lacerda CA. Maternal high-fat diet programs for metabolic disturbances in offspring despite leptin sensitivity. *Neuroendocrinology*. 2012;96(4):272-284.
 47. White CL, Purpera MN, Morrison CD. Maternal obesity is necessary for programming effect of high-fat diet on offspring. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(5).
 48. Yokomizo H, Inoguchi T, Sonoda N, et al. Maternal high-fat diet induces insulin resistance and deterioration of pancreatic β -cell function in adult offspring with sex differences in mice. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2014;306(10):1163-1175.
 49. Zou T, Chen D, Yang Q, et al. Resveratrol supplementation of high-fat diet-fed pregnant mice promotes brown and beige adipocyte development and prevents obesity in male offspring. *J Physiol*. 2017;595(5):1547-1562.
 50. Kruse M, Keyhani-Nejad F, Isken F, et al. High-fat diet during mouse pregnancy and lactation targets gip-regulated metabolic pathways in adult male offspring. *Diabetes*. 2016;65(3):574-584.
 51. Lumeng CN, Bodzin JL, Saltiel AR. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J Clin Invest*. 2007;117(1):175-184.
 52. Spitzer JA, Kovach AG, Rosell S, Sandor P, Spitzer JJ, Storck R. Influence of endotoxin on adipose tissue metabolism. *Adv Exp Med Biol*. 1972;33(0):337-344.
 53. Silvestri C, Di Marzo V. The endocannabinoid system in energy homeostasis and the etiopathology of metabolic disorders. *Cell Metab*. 2013;17(4):475-490.
 54. Lillycrop KA, Burdge GC. Maternal diet as a modifier of offspring epigenetics. *J Dev Orig Health Dis*. 2015;6(2):88-95.
 55. Ellsworth L, Harman E, Padmanabhan V, Gregg B. Lactational programming of glucose homeostasis: A window of opportunity. *Reproduction*. 2018;156(2):R23-R42.
 56. Berry DC, Stenesen D, Zeve D, Graff JM. The developmental origins of adipose tissue. *Dev*. 2013;140(19):3939-3949.
 57. Tang QQ, Lane MD. Adipogenesis: From stem cell to adipocyte. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:715-736.

58. Muhlhausler B, Smith SR. Early-life origins of metabolic dysfunction: role of the adipocyte. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(2):51-57.
59. Sun B, Purcell RH, Terrillion CE, Yan J, Moran TH, Tamashiro KKK. Maternal high-fat diet during gestation or suckling differentially affects offspring leptin sensitivity and obesity. *Diabetes.* 2012;61(11):2833-2841.
60. Carberry AE, Colditz PB, Lingwood BE. Body composition from birth to 4.5 months in infants born to non-obese women. *Pediatr Res.* 2010;68(1):84-88.
61. Rosen ED, Spiegelman BM. What we talk about when we talk about fat. *Cell.* 2014;156(1-2):20-44.
62. de Queiroz JCF, Alonso-Vale MIC, Curi R, Lima FB. Control of adipogenesis by fatty acids. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2009;53(5):582-594.
63. Yee JK, Lee WNP, Ross MG, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulation and lipogenic response in adipocytes of small-for-gestational age offspring. *Nutr Metab.* 2012;9(1).
64. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav.* 2008;94(2):206-218.
65. Blüher M. Importance of estrogen receptors in adipose tissue function. *Mol Metab.* 2013;2(3):130-132.
66. Tchkonina T, Tchoukalova YD, Giorgadze N, et al. Abundance of two human preadipocyte subtypes with distinct capacities for replication, adipogenesis, and apoptosis varies among fat depots. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2005;288(1 51-1).
67. *Diet and Health.* National Academies Press; 1989.

Attachments

Figure 1: Flowchart of article selection for systematic review and meta-analysis



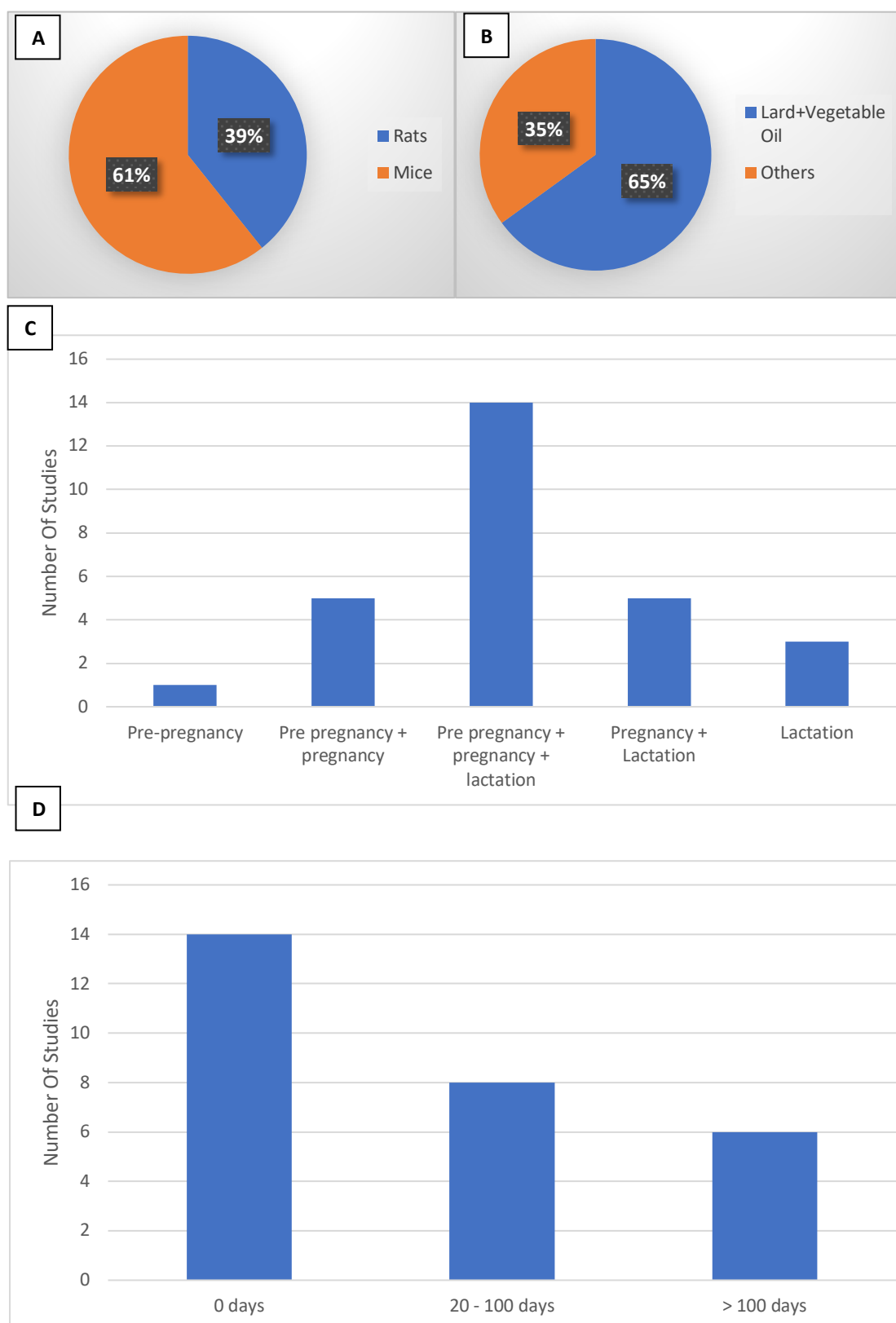


Figure 2. A- Distribution of animals used; B- Source of fat used for the production of the high-

fat diet; C- Period of consumption of the high-fat diet by mothers (pre-pregnancy; pre-pregnancy and pregnancy; pre-pregnancy, pregnancy and lactation; pregnancy and lactation and lactation); D- Time of consumption of the high-fat diet by the descendants in the studies included in the systematic review.

Table 1: Characteristics of the studies included in the systematic review

Author/year (Reference No.)	Animal	Animal number/gro up	Lipid Source	Composition DHL	Composition Diet Pattern	DHL consumption time Mothers (in days)	DHL consumption time descendants (in days)	Sex	Outcome
Almeida MM, 2017 (22)	Wistar	Control = 15 DHL = 15	lard + soy oil	17.3% PTN 26.6% LP 54.1% CHO	22.6% PTN 9.4% LP 68% CHO	56 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0	M + F	M + F Subcutaneous (↑ diameter) M + F + Visceral (↑ diameter)
Almeida MM, 2020 (23)	Wistar	Control = 15 DHL = 15	lard + soy oil	28.6% LP	9% LP	56 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0	M + F	Males Subcutaneous (↓ area) + Visceral (= area) Females Subcutaneous (↑ area) + Visceral (↑ area)
Bibi S, 2017 (24)	C57BL/ 6J	Control = 9 DHL = 9	NR	60% LP	10% LP	pregnancy + lactation	91	F	Subcutaneous + Visceral (↑ diameter)
Butruille L, 2019	Wistar	12 days of life (Control	lard + soy oil	20% PTN 60% LP	20% PTN 10% LP	lactation	0 90	M + F M	12 days of life Subcutaneous

(25)		and DHL) = 6 6 months of life (Control and DHL) = 4		20% CHO	70% CHO				(↑ area) (= number) + Visceral (↑ area) (= number) 6 months Subcutaneous (↑ area) (= number) + Visceral (↑ area) (↑ number)
Chang E, 2019 (26)	C57BL/ 6J	Control = 8 DHL = 16	lard + soy oil	20% PTN 60% LP 20% CHO	28.5% PTN 13% LP 57.9% CHO	42 pre- pregnancy + pregnancy	84	M + F	Subcutaneous (= area) + Visceral (↑ area) Visceral (↑ area)
Ding Y, 2013 (27)	C57BL/ 6J	Control = 4 DHL = 4	lard + soy oil	20% PTN 60% LP 20% CHO	NR	30 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	270	F	Visceral (↑ area)
Gregorio BM, 2013 (28)	C57BL/ 6	Control = 5 DHL = 5	NR	19% PTN 49% LP 32% CHO	19% PTN 17% LP 64% CHO	pregnancy lactation pregnancy + lactation	0	M	Visceral (↑ diameter)
Jiao F, 2016 (29)	C57BL/ 6	Control = 4 DHL = 5	NR	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	10 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0	M + F	Visceral (↑ area)

Kruse M, 2013 (30)	Wistar	Control = 3 DHL = 3	lard	20% PTN 35.5% PL 36.3% CHO	20% PTN 9% LP 53% CHO	15 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	133	M	Visceral (↑ area)
Lecoutre S, 2016 (31)	Wistar	Control = 6 DHL = 6	lard + soy oil	20% PTN 60% LP 20% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	112 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0	M + F	Males Visceral (↑ area) (↑ number) Females Visceral (= area) (= number)
Liang X, 2016 (32)	C57BL/ 6	Control = 6 DHL = 6	lard + soy oil	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	56 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0 90	M	Subcutaneous (↑ area) (=number) + Visceral (↑ area) (=number)
Liang X, 2016 (33)	C57/BL	Control = 8 DHL = 6	lard + soy oil	20% PTN 60% LP 20%CHO	10% LP	lactation	0	M	Subcutaneous (↑ area) + Visceral (↑ area)
Litzenburger T, 2020 (34)	C57BL/ 6N	Control = 4 DHL = 4	acid. linolenic	19% PTN 34% LP 47% CHO	27% PTN 16% LP 57% CHO	56 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0	M + F	M + F Visceral (↑ diameter)
Liu F, 2018 (35)	C57BL/ 6J	Control = 8	NR	26% LP	9% LP	98 pre- pregnancy +	0	NR	Subcutaneous (↑ area)

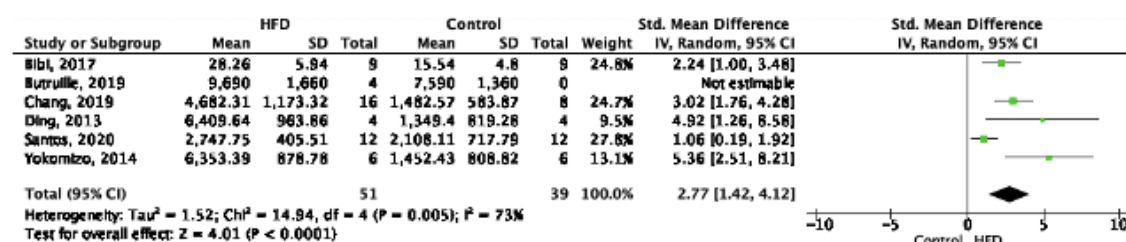
		DHL = 8				pregnancy + lactation			
Magliano CD, 2013 (36)	C57BL/ 6	Control = 10 DHL = 10	lard + soy oil	19% PTN 49% LP 32% CHO	14% PTN 10% LP 75% CHO	56 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0	M	Visceral (↑ diameter)
Murabayashi N, 2013 (37)	C57BL/ 6N	NR	NR	20% PTN 60%LP 20%CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	30 pre- pregnancy	0	M	Subcutaneous (↑ diameter)
Parente LB, 2008 (38)	Wistar	NR	Soy oil	20% PTN 49% LP 20% CHO	20% PTN 7% LP 62% CHO	pregnancy + ½ lactation	180	M	Visceral (↑ area)
Santos LS, 2020 (39)	Wistar	Control= 12 DHL/Control =11 DHL/DHL= 12	NR	17% PTN 23% LP 46% CHO	22% PTN 4% LP 57% CHO	pregnancy + lactation	120	M	Visceral (↑ area)
Segovia SA, 2018 (40)	Spragu e- Dawley	Control= 7 DHL = 7	NR	45% LP	10% LP	21 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	0	M	Visceral (= area)
Sellayah D, 2019 (41)	C57BL/ 6J	Control = 5 DHL = 5	NR	20% PTN 45% LP 35% CHO	17.5% PTN 7.4% LP 75% CHO	42 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	182	M + F	Visceral (↑ area) (↑ number)
Snajder D, 2019 (42)	Spragu e- Dawley	Control = 6 DHL = 6	palm oil	27.2% PTN 28% LP 30% CHO	21.7% PTN 0.4% LP 66.5% CHO	42 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	133	M	Subcutaneous (↑ area) (= number) + Visceral (↑ area)

(= number)

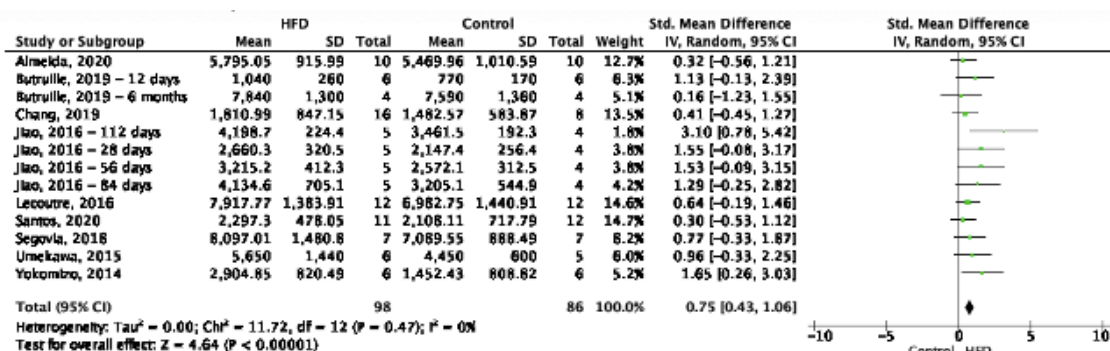
Tsai T, 2020 (43)	Sprague e- Dawley	Control = 14 DHL = 13	soy oil + coconut oil	17% PTN 58% LP 25% CHO	NR	56 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	56	M	Subcutaneous (= area) + Visceral (= area)
Tsuduki T, 2013 (44)	C57BL/ 6J	Control = 12 DHL = 12	lard	24% PTN 14% LP 62% CHO	25% PTN 5% LP 70% CHO	lactation	30	M	Visceral (↑ area)
Umekawa T, 2015 (45)	C57BL/ 6	Control = 5 DHL = 6	lard + soy oil	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	42 pre- pregnancy + pregnancy	0	M	Subcutaneous (= area) + Visceral (↑ area)
Volpato AM, 2012 (46)	C57BL/ 6	Control = 6 DHL = 6	lard	19% PTN 49% LP 32% CHO	19% PTN 17% LP 64% CHO	pregnancy + lactation	63	M	Subcutaneous + Visceral (↑ area)
White CL, 2009 (47)	Long- evans	Control = 5 DHL = 5	lard + soy oil	20% PTN 60% LP 20% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	30 pre- pregnancy + pregnancy + lactation	84	M	Visceral (↑ area) (= number)
Yokomizo H, 2014 (48)	C57BL/ 6J	Control = 3 DHL = 3	lard + soy oil	18.2% PTN 62.2% LP 19.6% CHO	18.2% PTN 11.5% LP 70.3% CHO	pregnancy + lactation	98	M + F	Visceral (↑ area)
Zou T, 2017 (49)	C57BL/ 6J	Control = 8 DHL = 8	lard + soy oil	20% PTN 45% LP 35% CHO	20% PTN 10% LP 70% CHO	pregnancy + lactation	77	M	Subcutaneous (↑ area) + Visceral (↑ area)

DHL: Hyperlipidic Diet. NR: Not reported. PTN: Protein. LP: Lipids. CHO: Carbohydrates. M: Males. F: Females.

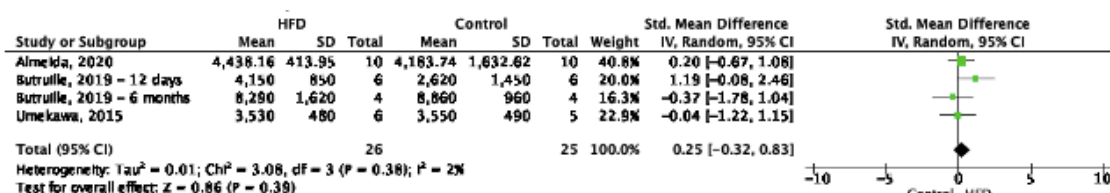
1. Area of visceral adipose tissue of offspring who consumed DHL, whose mothers consumed DHL



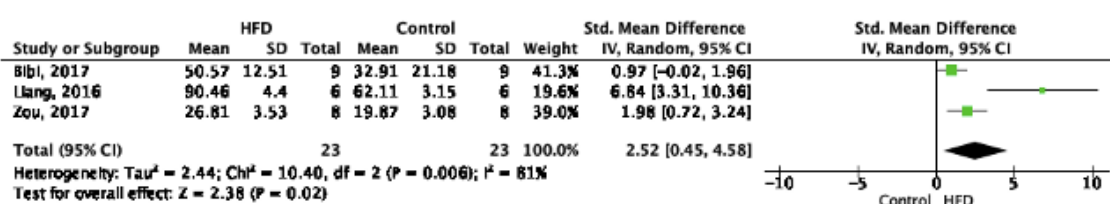
2. Area of visceral adipose tissue of offspring who consumed control diet, whose mothers consumed DHL



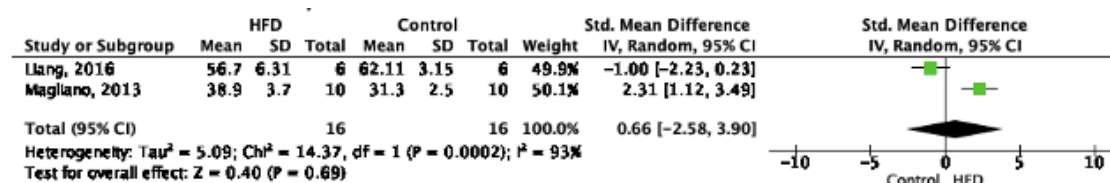
3. Area of subcutaneous adipose tissue of offspring who consumed control diet, whose mothers consumed DHL



4. Diameter of visceral adipose tissue of offspring who consumed DHL, whose mothers consumed DHL



5. Diameter of visceral adipose tissue of offspring who consumed control diet, whose mothers consumed DHL



6. Diameter of subcutaneous adipose tissue of offspring who consumed DHL

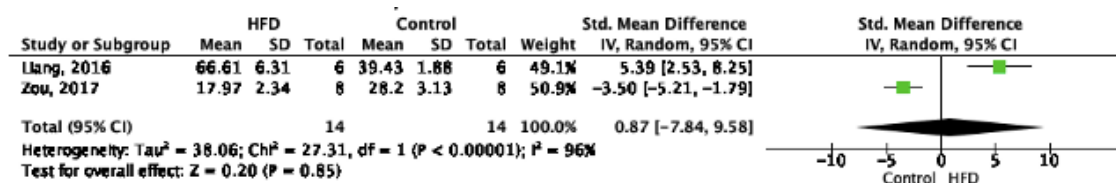
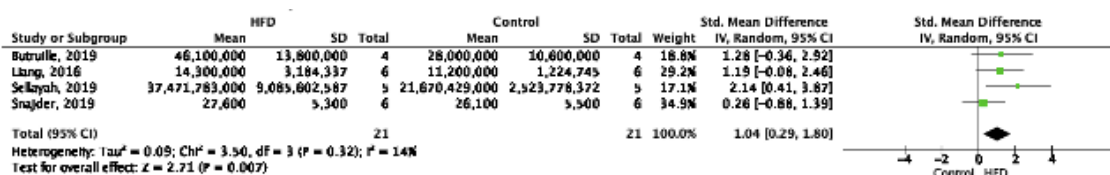
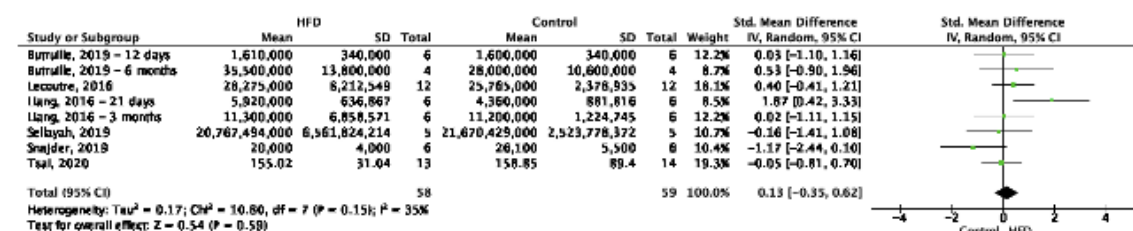


Figure 3. Forest plot of the meta-analysis of the main outcomes. 95% CI, 95% confidence interval; IV, inverse of the variance; DHL, hyperlipidic diet.

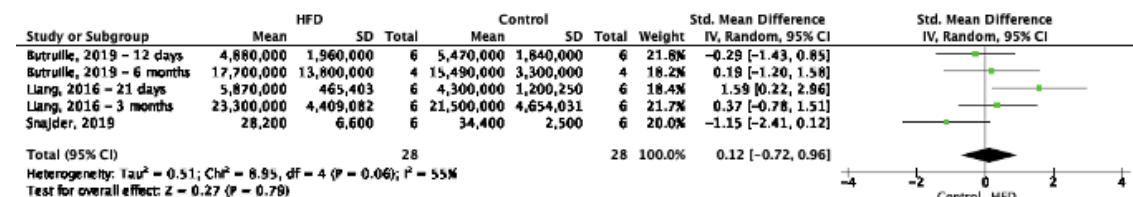
1. Number of adipocytes from the visceral adipose tissue of offspring who consumed DHL, whose mothers consumed DHL



2. Number of adipocytes from the visceral adipose tissue of offspring who consumed control diet, whose mothers consumed DHL



3. Number of adipocytes from the subcutaneous adipose tissue of offspring who consumed control diet, whose mothers consumed DHL



4. Number of adipocytes from subcutaneous adipose tissue of offspring who consumed DHL, whose mothers consumed DHL

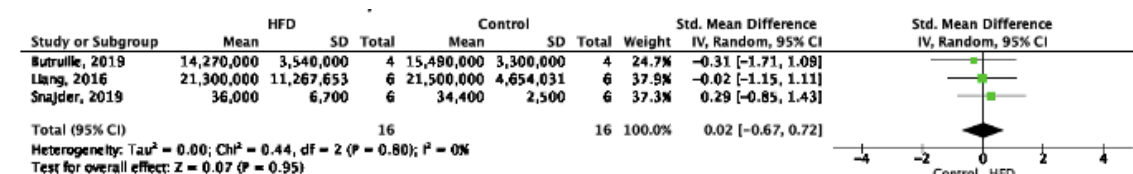
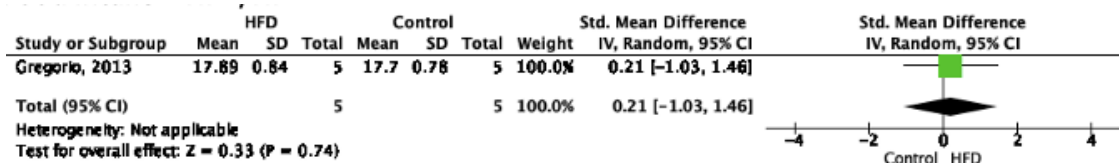


Figure 4. Forest plot of the meta-analysis of the main outcomes. 95% CI, 95% confidence interval; IV, inverse of the variance; DHL, hyperlipidic diet.

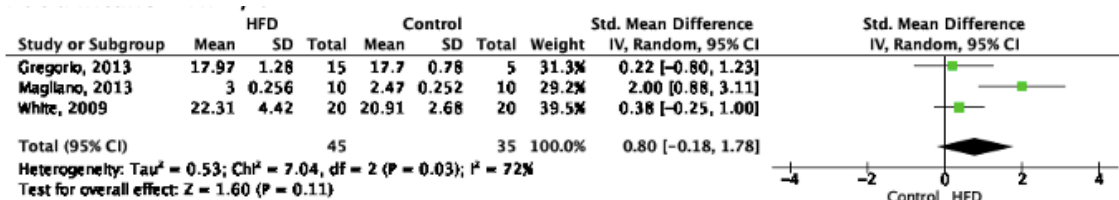
		MALES			FEMALES		
		Standardized Mean difference (95% CI)	P	I ²	Standardized Mean difference (95% CI)	P	I ²
DHL/DHL	VISCERAL						
	DIAMETER	4.12(-0.61-8.85)	0.09	85%	1.36 (0.31-2.41)	0.01	NA
	AREA	1.25(0.19-2.32)	0.02	24%	2.61(1.47-6.91)	<0.00001	1%
	NUMBER	0.68(-0.23-1.58)	0,14	12%			
	SUBCUTANEOUS						
	DIAMETER	4.08(2.37-5.79)	P<0.00001	19%			
	AREA	1.42(-0.27-3.12)	0.10	NA			
	NUMBER	0.13(-0.67-0.94)	0.74	0%			
	VISCERAL						
DHL/C	DIAMETER	0.65(-2.62-3.91)	0.7	93%			
	AREA	0.59(0.14-1.04)	0.01	0%	0.65(-0.14-2.77)	0.11	0%
	NUMBER	0.42(-0.59-1.42)	0.42	73%	-0.67(-1.85-0.51)	0.27	NA
	SUBCUTANEOUS						
	DIAMETER	0.08(-1.05-1.21)	0.89	NA			
	AREA	-0.79(-2.10-0.51)	0.23	58%	4.21(1.54-6.89)	0.002	NA
	NUMBER	0.25(-1.23-1.74)	0.74	76%			
	VISCERAL						
	DIAMETER						

Table 2. Summary of the results of the meta-analysis of the morphological outcomes (diameter, area and number) of visceral and subcutaneous white adipose tissue of mice exposed to a high-fat diet or a control diet.

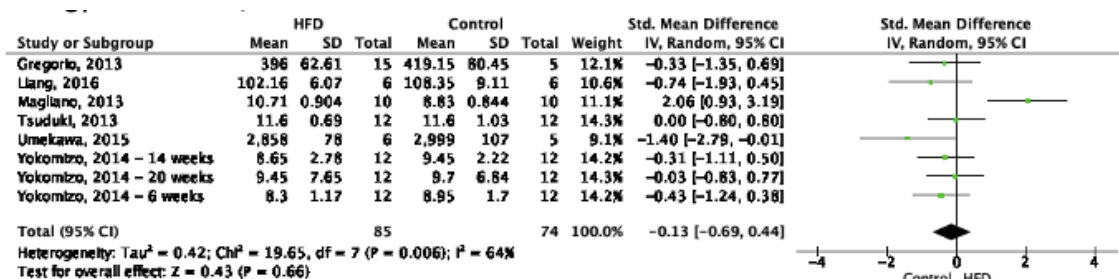
1. Feed consumption of offspring who consumed DHL, whose mothers consumed DHL



2. Feed consumption of offspring who consumed control diet, whose mothers consumed DHL



3. Energy consumption of offspring who consumed control diet, whose mothers consumed DHL



4. Energy consumption of offspring who consumed DHL

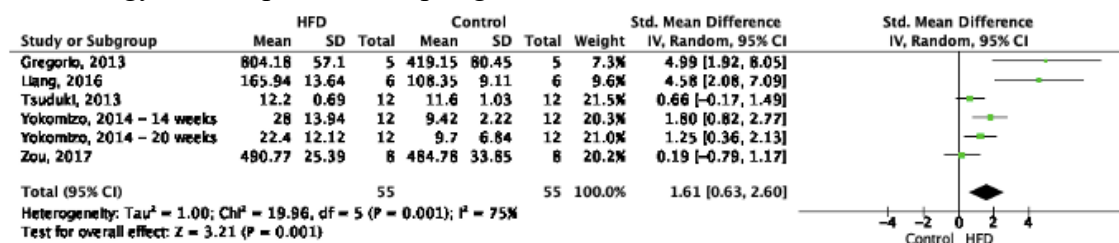


Figure 5. Forest plot of the meta-analysis of the main outcomes. Food consumption in feed and Energy. 95% CI, 95% confidence interval; IV, inverse of the variance; DHL, hyperlipidic diet.

Appendix 1. Pubmed search strategy at 18/08/2020

(rat OR rats OR rattus OR (rattus norvegicus) OR mice* OR mouse OR rodent* OR Mus OR (mus musculus) OR (mice, house) OR (house mice) OR (mouse, house) OR (house mouse) OR (mus domesticus) OR (mus musculus domesticus) OR (domesticus, mus musculus) OR (mice, laboratory) OR (laboratory mice) OR (mouse, laboratory) OR (laboratory mouse) OR (mouse, swiss) OR (swiss mouse) OR (swiss mice) OR (mice, swiss)) AND ((high fat) OR (high-fat) OR (high-fat diet*) OR (high fat diet*) OR (dietary fat) OR (high-fat feed*) OR (high fat feed*) OR (high-fat fed) OR (high fat fed) OR (lard-fed, fat-rich) OR (diet-induced obesity) OR (lipid diet)) AND ((maternal obesity) OR maternal OR mother OR dam OR dams OR perinatal OR prenatal* OR pre-natal* OR gestat* OR pre-pregn* OR pre-pregn* OR pregestat* OR pre-gestat* OR pregravid* OR pre-gravid* OR gravid* OR mating OR preconcept* OR pre-concept* OR conception OR fetal* OR fetus OR pups OR pregnan* OR (expos* in utero) OR (intrauterine expos*) OR (intra-uterine expos*) OR (prenatal exposure delayed effects) OR offspring* OR progeny OR lactation OR litter) AND (leptin OR adipocyte OR adipokines OR adipogenesis OR adiponectin OR TNF α OR TNFalpha OR (tumor necrosis factor-alpha) OR IL-6 OR (interleukin 6) OR interleukin OR (adipose tissue) OR (Brown adipose tissue) OR BAT OR (brown fat) OR (white adipose tissue) OR WAT OR (white fat))

Appendix 2. Forest plot of the meta-analysis of the adipocyte area of white adipose tissue in the subcutaneous region of offspring who consumed DHL from mothers who consumed DHL

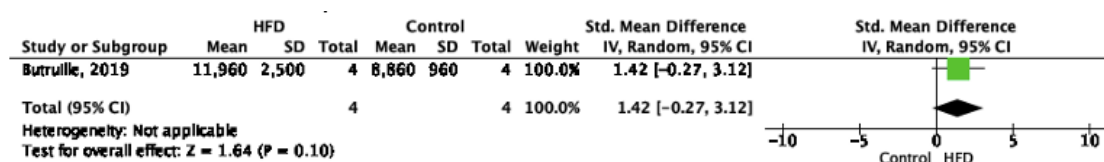
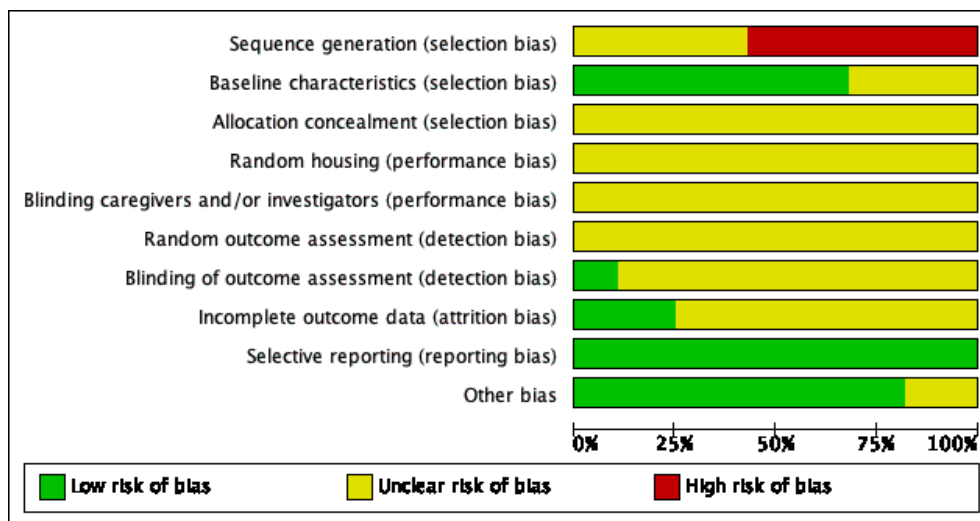


Figure 5. Risk of bias in the studies included for the systematic review.



Obesity - Manuscript ID 21-0361-Orig

Obesity <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Wed 4/28/2021 10:52 PM

To: gi.vesentini@hotmail.com <gi.vesentini@hotmail.com>
Cc: cacasaullo@hotmail.com <cacasaullo@hotmail.com>; damascenofmb@gmail.com <damascenofmb@gmail.com>; gtvoldpato@gmail.com <gtvoldpato@gmail.com>; yurisin zato@gmail.com <yurisin zato@gmail.com>; barshana.karki@gmail.com <barshana.karki@gmail.com>; gi.vesentini@hotmail.com <gi.vesentini@hotmail.com>

28-Apr-2021

Dear Dr. Vesentini:

Your manuscript titled "Maternal high-fat diet on adipose tissue in murine offspring: A systematic review and meta-analysis" has been received by the journal Obesity via its online submission system.

Your manuscript ID is 21-0361-Orig.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to Manuscript Central at <https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fobesity&data=04%7C01%7C%7Cd8e1e4839c814d5e2aeb08d90a9843d9%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637552471349095322%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLCJBTil6Ik1haWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&sdata=6azLF0t6EUm gE99jcf0vURY03lX8MaqfHg%2B0fYhvw88%3D&reserved=0> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fmc.manuscriptcentral.com%2Fobesity&data=04%7C01%7C%7Cd8e1e4839c814d5e2aeb08d90a9843d9%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637552471349105278%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLCJBTil6Ik1haWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&sdata=Ohs62bIf0nh8 nOVzEm0NksY9ln%2BFEEq4Ws22c2JYZRg%3D&reserved=0>.

Please note that all accepted manuscripts (with the exception of INVITED manuscripts) incur page charges for publication. There are additional charges for printing color figures and opting for Open Access.

Enjoy a discount on page charges if the First or Corresponding author is a member of The Obesity Society. Pricing is \$65/page for members and \$95/page for non-members. Check out our website at <https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fwww.obesity.org%2F&data=04%7C01%7C%7Cd8e1e4839c814d5e2aeb08d90a9843d9%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637552471349105278%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzIiLCJBTiI6Ikl1haWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&sdata=4GdM530KXtu29pedq%2FrVuiE qV2V2i0JngxvgSI56l6c%3D&reserved=0> to see all the benefits of membership.

This journal offers a number of license options for published papers; information about this is available here: <https://na01.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fauthorservices.wiley.com%2Fauthor-resources%2FJournal-Authors%2Flicensing%2Findex.html&data=04%7C01%7C%7Cd8e1e4839c814d5e2aeb08d90a9843d9%7C84df9e7fe9f640afb435aaaaaaaaaaaa%7C1%7C0%7C637552471349105278%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWIjoiMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzIiLCJBTiI6Ikl1haWwiLCJXVCI6Mn0%3D%7C1000&sdata=eIof9RHVYD9mvowyk4ROVUEI%2BhGUr uTDoTIO5%2FdfiKg%3D&reserved=0>. The submitting author has confirmed that all co- authors have the necessary rights to grant in the submission, including in light of each co- author's funder policies. If any author's funder has a policy that restricts which kinds of license they can sign, for example if the funder is a member of Coalition S, please make sure the submitting author is aware.

Thank you for submitting your manuscript to Obesity.

Sincerely,
Obesity Editorial Office editorial@obesity.org

