



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA RUGILA DOS SANTOS STOPA

**SUPERNUTRIÇÃO POR REDUÇÃO DA NINHADA:
EFEITOS NOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
REPRODUTIVOS EM RATAS**

Londrina
2019



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



Programa Multicêntrico
de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

LARISSA RUGILA DOS SANTOS STOPA

**Supernutrição por redução da ninhada: efeitos nos
parâmetros metabólicos e reprodutivos em ratas**

Londrina
2019

LARISSA RUGILA DOS SANTOS STOPA

**SUPERNUTRIÇÃO POR REDUÇÃO DA NINHADA:
EFEITOS NOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
REPRODUTIVOS EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa.
Coorientadora: Profa. Dra. Cássia Thaís B. V. Zaia.

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

S883s Stopa, Larissa Rugila dos Santos.
Supernutrição por redução da ninhada: efeitos nos parâmetros metabólicos e reprodutivos em ratas / Larissa Rugila dos Santos Stopa. - Londrina, 2019.
42 f. : il.

Orientador: Emane Torres Uchôa.
Coorientador: Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2019.
Inclui bibliografia.

1. supemutrição neonatal - Tese. 2. estradiol - Tese. 3. fertilidade - Tese. 4. kisspeptina - Tese. I. Torres Uchôa, Emane. II. Thaís Bussamra Vieira Zaia, Cássia. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

CDU 612

LARISSA RUGILA DOS SANTOS STOPA

**SUPERNUTRIÇÃO POR REDUÇÃO DA NINHADA:
EFEITOS NOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
REPRODUTIVOS EM RATAS**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, na Universidade Estadual de Londrina, PR, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

COMISSÃO EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Maria Fernanda R. Graciano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Glaura Scantamburlo A. Fernandes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 29 de novembro de 2019.

Dedico este trabalho à toda minha família, mas especialmente ao meu esposo, à minha mãe, à Vó Sueli e à Ana Luiza, minha irmã, por todo o apoio e incentivo para que os meus sonhos se tornassem realidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me proporcionado saúde, bênçãos e forças para que eu tornar o sonho em realidade.

Agradeço ao meu orientador, Prof Dr Ernane, por todo carinho, paciência, disponibilidade, confiança e por me ensinar tanto. Muito obrigada por tudo. Com certeza, a experiência do mestrado foi muito mais calma e gratificante por tê-lo ao lado, e que venham novos desafios e anos de trabalho, parceria e cumplicidade.

À profª Drª Thaís Zaia, minha primeira orientadora, por toda ajuda desde o primeiro dia, sempre amável, amiga, preocupada e disponível para tudo. Obrigada por todo o ensinamento e exemplo de pessoa, tanto profissional como pessoal.

A todos do Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo, eu deixo meu agradecimento, por sempre estarem dispostos a ajudar. Andressa, Camila, Gabriela, Érica, Heloisa, Marcela, Lucas e Fabiano, não tenho palavras para vocês. Pessoas maravilhosas que me fizeram muito mais feliz durante esses anos, obrigada por todos os momentos compartilhados!

À minha família, pois sem eles nada disso seria possível. Obrigada pelo apoio incondicional, pelo amor, pela paciência, e por entrarem de cabeça junto comigo no meu sonho e então lutarem, se sacrificarem e fazerem de tudo para que se tornasse possível. A minha caminhada não teria sido tão colorida e pacífica como foi, se eu não contasse sempre com a ajuda de vocês. Nem todas as palavras de gratidão desse mundo seriam suficientes para expressar o meu sentimento. Vocês são a minha base e a razão que me faz querer sempre ser melhor, crescer e lutar pelos meus objetivos. Orgulhá-los é o que eu mais quero, sempre.

Ao meu esposo, Willian, um agradecimento especial. É quem acompanha cada alegria e dificuldade. Me consola, conforta, incentiva, apoia. Obrigada por toda a ajuda de sempre! Por compreender minha dedicação ao Mestrado, os experimentos aos finais de semana, feriados e finais de ano. A conquista é nossa!

Aos docentes, discentes e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas, no auxílio para a realização deste trabalho.

Agradeço aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro, que tornou possível a realização deste projeto e a dedicação exclusiva ao Mestrado.

"Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota."

Madre Teresa de Calcutá

STOPA, L. R. S. **Supernutrição por redução da ninhada**: efeitos nos parâmetros metabólicos e reprodutivos em ratas. 2019. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

O aumento do número de crianças com excesso de peso no mundo tem sido observado nas últimas décadas, e a obesidade infantil pode persistir até a idade adulta, quando disfunções reprodutivas podem ser observadas. A supernutrição neonatal tem sido um modelo de programação experimental utilizado para induzir obesidade desde a infância até a vida adulta. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da obesidade induzida por supernutrição neonatal em parâmetros metabólicos e reprodutivos em ratas. Para isso, parâmetros metabólicos, desenvolvimento sexual, eixo hipotalâmico-hipofise-gônadas e fertilidade foram avaliados em fêmeas Wistar de ninhadas normais (normal litter, NL, 10 filhotes) e pequenas (small litter, SL, 3 filhotes). Os resultados mostraram que as ratas criadas em SL apresentaram alterações metabólicas como intolerância à glicose, maior peso corporal, adiposidade, índice de Lee e concentrações plasmáticas de corticosterona, em associação com disfunções reprodutivas, demonstradas pela abertura vaginal e primeiro estro precoces, início tardio de ciclicidade regular, bem como redução da fertilidade relacionada com a diminuição das concentrações plasmáticas de estradiol, expressão de RNAm de tirosina hidroxilase no locus coeruleus e hormônio liberador de gonadotrofina e kisspeptina na região pré-óptica em fêmeas adultas na tarde de proestro. Em conjunto, como estes resultados observa-se que a obesidade induzida por supernutrição neonatal em ratas fêmeas promove disfunções reprodutivas não apenas na puberdade, mas também na idade adulta.

Palavras-chave: supernutrição neonatal; estradiol; fertilidade; kisspeptina; GnRH, locus coeruleus.

STOPA, L. R. S. **Overnutrition induced by litter size reduction:** effects on metabolic and reproductive parameters in female rats. 2019. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Increased number of overweight children in the world has been observed in the last decades, and childhood obesity can persist until adulthood, when reproductive dysfunctions may be observed. Neonatal overfeeding has been an experimental programming model used to induce obesity from childhood to adult life. This work aimed to evaluate the effect of neonatal-overfeeding-induced obesity in reproductive parameters in female rats. For this, metabolic parameters, sexual development, hypothalamic-pituitary-gonad axis and fertility were evaluated in females rats of normal (NL; 10 pups) and small (SL; 3 pups) litters. The results showed that females rats reared in small litter exhibited metabolic changes as glucose intolerance, higher body weight, adiposity, Lee index and corticosterone plasma levels, in association with reproductive dysfunctions, shown by earlier vaginal opening and first estrous, later onset of regular cyclicity, as well as reduced fertility related with decreased estradiol plasma levels, mRNA expression of tyrosine hydroxylase in the locus coeruleus and kisspeptin and gonadotropin releasing hormone in the preoptic area in adult females in the afternoon of proestrous. Altogether these results suggest that neonatal overfeeding-induced obesity in female rats promotes reproductive dysfunctions not only in the puberty but also in the adulthood.

Key-Words: neonatal overnutrition; estradiol; fertility; kisspeptin; GnRH, locus coeruleus.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Delineamento experimental do Protocolo 1: manejo após nascimento para avaliação de parâmetros reprodutivos e metabólicos 15
- Figura 2** - Delineamento experimental do Protocolo 2..... 18
- Figura 3** - Delineamento experimental do GTT..... 19
- Figura 4** - Curva de peso corpóreo (g) (A), Distância anogenital ($\text{mm/g}^{1/3}$) (B), Peso corporal (g) (C), Ingestão alimentar (g/100g) (D), Índice de Lee ($\text{g}^{1/3}/\text{cm}$) (E), Peso do tecido adiposo perigonadal+perirrenal (g/100g) (F) e Peso do tecido adiposo retroperitoneal (g/100g) (G) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como média \pm EPM, para teste t, e mediana (1° - 3° intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ $n=18$)..... 21
- Figura 5** - Abertura vaginal (DPN) (A), Primeiro estro (DPN) (B), Regularização do ciclo estral (DPN) (C) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como média \pm EPM, para teste t, e mediana (1° - 3° intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ ($n=18$)..... 22
- Figura 6** - Concentração plasmática de glicose (mg/dL) (A), triglicérides (mg/dL) (B), colesterol (mg/dL) (C), corticosterona ($\mu\text{g/dL}$) (D), teste de tolerância à glicose (GTT) (E) e área sob curva (AUC) do GTT (F) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Teste t. Dados expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ ($n=9$) 23
- Figura 7** - Expressão de RNAm de GnRH na APO (A), Expressão de RNAm de Kisspeptin na APO (B), Expressão de RNAm de TH no LC (C) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como mediana (1° - 3° intervalo interquartil) no teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ ($n=5-8$) 24
- Figura 8** - Concentrações plasmáticas de LH (mIU/mL) (A), estradiol (pg/mL) (B), progesterona (pg/mL) (C) e testosterona (ng/mL) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como média \pm EPM, para teste t, e mediana (1° - 3°

intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$
($n=9$)..... 25

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Avaliação do ciclo estral durante 16 dias. Dados expressos como mediana (1^o-3^o intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. *p<0,0522
- Tabela 2** - Taxas de fertilidade de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos em média ± EPM (teste t) ou mediana (1^o-3^o intervalo interquartil) (teste de Mann-Whitney). *P<0,05 (n=11-17).....26
- Tabela 3** - Peso das glândulas adrenais (mg/100g), peso dos ovários (mg/100g) e peso do útero (mg/100g) de NL e SL. Dados expressos em ± EPM. *P<0,05 (n=12-16).....26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARC	Núcleo Arqueado do hipotálamo
APO	Área Pré-Óptica do hipotálamo
AUC	Área sobre a curva
DAG	Distância Anogenital
DG	Dia Gestacional
DL	Dia Lactacional
DPN	Dia pós-natal
EPM	Erro padrão da média
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
GTT	Teste de Tolerância à Glicose
HHG	Eixo Hipotálamo-Hipófise-Gônadas
LC	Locus Coeruleus
LH	Hormônio Luteinizante
NA	Neurônios Noradrenérgicos
NL	<i>Normal Litter</i> (ninhada normal)
OVX	Ovariectomia
OMS	Organização Mundial de Saúde
SL	<i>Small Litter</i> (ninhada pequena)
TH	Tirosina Hidroxilase
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	13
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	14
3.2	PROCOLOS EXPERIMENTAIS	14
3.2.1	Protocolo 1	15
3.2.1.1	Distância anogenital normalizada.....	15
3.2.1.2	Desenvolvimento sexual: abertura vaginal e primeiro estro	16
3.2.1.3	Determinação do ciclo estral	16
3.2.1.4	Índice de Lee.....	16
3.2.1.5	Dosagens	16
3.2.1.6	Microdissecção, extração total de RNA e PCR em tempo real quantitativo	17
3.2.2	Procolo 2	17
3.2.2.1	Cálculo do ciclo estral	18
3.2.2.2	Teste de tolerância à glicose (GTT)	18
3.2.2.3	Análise de fertilidade	19
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	19
4	RESULTADOS	20
5	DISCUSSÃO	26
6	CONCLUSÃO	30
7	REFERÊNCIAS	31
	ANEXO - Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL.....	37

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a obesidade como um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, e sua prevalência atinge proporções epidêmicas. Há uma grande preocupação quanto a isso, uma vez que o sobrepeso e a obesidade estão associados a elevado risco de doenças e outras comorbidades. Segundo a Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção de Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel, 2016), a obesidade é uma realidade para 18,9% dos brasileiros, enquanto o sobrepeso atinge mais da metade da população (54%). Entre os jovens, a obesidade aumentou 110% entre 2007 e 2017. Esse índice foi quase o dobro da média nas demais faixas etárias (60%). A projeção é que, em 2025, o número de crianças com sobrepeso e obesidade no mundo pode chegar a 75 milhões (OMS, 2017).

A crescente frequência de obesidade infantil é resultado de múltiplos fatores, que incluem a condição genética, comportamento familiar e pessoal, ambiente escolar, entre outros. Estudos mostraram que o ambiente influencia o desenvolvimento da prole durante o início da vida, acarretando mudanças fisiológicas persistentes. A exposição ao estresse durante a gestação (PANKEVICH et al., 2009), supernutrição materna e diabetes gestacional, por exemplo, aumentam a incidência de obesidade e síndrome metabólica na próxima geração (SULLIVAN et al., 2011). Além disso, evidências sugerem que o peso corporal da infância é um indicador da saúde futura de uma criança e que a obesidade infantil aumenta o risco de obesidade adulta e distúrbios metabólicos associados (DELLO et al., 2013), como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer (MUST et al., 1992).

Além de fatores genéticos e exposição a estímulos ambientais, já foi observado que a programação epigenética pré-natal e neonatal também tem um papel importante na determinação de alterações hereditárias, uma vez que o epigenoma é dinâmico (DE BOO & HARDING, 2006). Em roedores, observou-se que a programação neonatal, expondo a ninhada a estímulos durante o início do desenvolvimento, quando os sistemas são mais sensíveis às alterações do meio, resultará em efeitos na vida adulta (BARKER, 1998). Um dos interferentes no desenvolvimento é a nutrição, que em excesso, pode levar à expressão de fenótipo obeso na infância, adolescência e vida adulta (VELKOSKA et al., 2005; STEFANIDIS et al., 2012).

Nos últimos anos, foi relatado que a manipulação do tamanho da ninhada em animais, causando alteração nutricional durante o período neonatal, altera a regulação

metabólica ou endócrina. O desequilíbrio nutricional durante este período de plasticidade pode modular o desenvolvimento dos sistemas de homeostase energética. O método de redução de ninhada tem sido utilizado para observar os efeitos do excesso de alimentação precoce em longo prazo, causando consequências na ingestão alimentar, ganho de peso corporal (RODRIGUES et al., 2007) e alterações metabólicas como, por exemplo, levando à resistência insulínica e dislipidemias (BOULLU-CIOCCA et al., 2005).

Neste modelo experimental, aproximadamente no dia pós-natal (DPN) 3, os animais são alocados em ninhada pequena (small litter - SL) e ninhada normal (normal litter - NL). Na ninhada pequena tem-se de 3-4 filhotes, em comparação à ninhada normal, controle que contém de 10-12 filhotes (SPENCER, 2013). Vários estudos utilizaram o ajuste do tamanho da ninhada para investigar os efeitos da nutrição sobre os parâmetros de desenvolvimento, uma vez que nas SLs os filhotes têm maior disponibilidade de leite, induzindo superalimentação, o que mostra uma tendência dos animais de tornarem-se obesos durante o período de amamentação, além de excesso de peso na vida adulta. (BABICKY et al., 1973; BASSET & CRAIG, 1988).

No Brasil, a frequência de obesidade é ligeiramente maior em mulheres (19,6%) do que em homens (18,1%), mas em ambos os sexos, essa frequência aumenta duas vezes da faixa de 18 a 24 anos para a faixa de 25 a 34 anos de idade (VIGITEL, 2016). Mulheres em idade reprodutiva apresentam numerosas comorbidades como resultado do sobrepeso e obesidade, e estudos mostram que a fertilidade é negativamente influenciada pelo excesso de peso. A obesidade em mulheres relaciona-se à maior frequência de irregularidade menstrual, atraso para concepção espontânea (PASQUALI et al., 2007), maior prevalência de infertilidade, abortos naturais e menor resposta aos tratamentos de infertilidade (NELSON & FLEMING, 2007). Vários fatores podem estar envolvidos na interação entre obesidade e infertilidade como, por exemplo, a modificação nos esteroides sexuais ovarianos, hiperandrogenismo, alteração da expressão gênica, ovócitos de baixa qualidade, além de alteração nos embriões e no ambiente uterino (ROBKER et al., 2008; ROBKER, et al., 2009).

A instalação da puberdade em humanos (CHOI et al., 2013) e roedores obesos tende a ser precoce (VENANCIO et al., 2017), e este é um processo de maturação reprodutiva composto por eventos que culminam na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (HHG), levando o indivíduo a atingir a capacidade reprodutiva. A puberdade é iniciada pela ativação dos neurônios que produzem e secretam o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo. O início precoce da puberdade tem sido associado à obesidade infantil em meninas, indicando a influência do tecido adiposo corporal no

momento da puberdade. Em roedores pré-púberes, a exposição a uma dieta hiperlipídica, iniciada após o desmame, precipita a puberdade (FRISCH et al., 1975), evidenciada por abertura vaginal precoce e primeiro estro, ambos marcadores de maturação puberal (LIE & MIKKELSEN, 2013; ZHOU et al., 2014). Além disso, também há evidências de uma associação entre obesidade causada por redução de ninhada e disfunção reprodutiva, de modo que ratas criadas em ninhadas pequenas, apresentaram uma antecipação da puberdade (CARVALHO et al., 2016) e perturbação da ciclicidade estral imediatamente após a puberdade (WU et al., 2016). Esses achados indicam que os sinais relacionados à adiposidade são fatores importantes no desenvolvimento sexual.

O GnRH hipotalâmico é o sinal imediato para a produção e liberação de gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH), pelas células especializadas (gonadotrofos) pela hipófise anterior. O GnRH é liberado de maneira pulsátil por neurônios espalhados na área pré-óptica (APO) e núcleo arqueado (ARC) do hipotálamo (BELCHETZ et al., 1978). O FSH estimula a secreção de estrogênio, responsável pelo desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos, além de regular o crescimento, desenvolvimento, puberdade e a reprodução (SARAIVA et al., 2010).

Nas mulheres o LH apresenta diferentes funções nos ciclos menstruais. Ele estimula a esteroidogênese e conseqüentemente a produção dos hormônios sexuais. Além disso, seu aumento abrupto liberado pela adeno-hipófise durante o ciclo menstrual, em um curto intervalo de 24 a 48 horas, denominado pico de LH, desencadeia a ovocitação (ovulação), além de promover a conversão das células remanescentes do folículo ovariano em corpo lúteo, que produzirá progesterona e estradiol. O LH é indispensável para a manutenção desta função do corpo lúteo na segunda metade do ciclo menstrual. A exposição mínima ao LH necessária para a maturação satisfatória do ovócito é o denominado "Limiar do LH". Abaixo da concentração limiar, pode haver maturação inadequada dos ovócitos (SARAIVA et al., 2010).

Os neurônios GnRH não expressam os receptores para estrógeno e progesterona que traduzem os efeitos de feedback nestes neurônios (HERBISON & THEODOSIS, 1992, SKINNER et al., 2001), de modo que são necessários interneurônios para fazer a mediação dos feedbacks realizados pelos hormônios ovarianos nos neurônios GnRH. O neurônio kisspeptinérgico ou neurônio kiss1, produtores de kisspeptina, tem sido o interneurônio mais amplamente estudado nos últimos anos. Estudos apontam que a kisspeptina está envolvida na transmissão de sinais de feedbacks fisiológicos para os neurônios GnRH ou na liberação pulsátil do GnRH/LH (SMITH, 2012). Em roedores, duas das principais populações de neurônios de kisspeptina foram descritas na APO e ARC,

mas a maior população desses neurônios localiza-se na região periventricular ântero-ventral (AVPV) da APO (SMITH et al., 2005), principal local de ação do estradiol no feedback positivo (GOODMAN, 1978). As duas populações de neurônios de kisspeptina expressam receptores estrogênicos e se projetam diretamente para os neurônios GnRH, que por sua vez expressam o receptor para kisspeptina (HERBISON, 2008; HAN, et al., 2005). Descobertas anteriores sugerem que os neurônios kisspeptina no APO são importantes integradores de sinais estrogênicos (ROBERTSON et al., 2009; WILLIAMS et al., 2011). Dessa forma, foi demonstrado que os efeitos estimulatórios em longo prazo do estradiol no sistema kisspeptina são essenciais para a gênese dos picos de GnRH/LH, e a progesterona recruta neurônios kisspeptina da APO, potencializando e antecipando os picos de GnRH/LH. Porém se faz necessária a exposição ao estradiol para essas ações da progesterona (LEITE et al., 2016).

Além da kisspeptina, tem sido demonstrado que os neurônios noradrenérgicos (NA) do tronco encefálico também apresentam um papel importante na geração dos picos pré-ovulatórios de GnRH e LH (HERBISON, 1997). Como evidências disso, tem-se que os neurônios GnRH expressam receptores adrenérgicos (HOSNY & JENNES, 1998); neurônios NA no tronco encefálico de A1, A2 e locus coeruleus (LC) expressam receptor estrogênico e de progesterona (HAYWOOD et al., 1999; HELENA et al., 2009) e projetam-se para a APO e hipotálamo basal medial (MBH), onde o corpo celular (APO) e terminais (APO e MBH) de neurônios GnRH estão localizados, respectivamente (WRIGHT & JENNES, 1993). Durante o feedback positivo, há aumento da liberação de NA na APO no momento do pico de LH no proestro e em ratas ovariectomizadas (OVX) tratadas com esteroides ovarianos (DEMLING et al., 1985; SZAWKA et al., 2007). Também foi demonstrado que tanto a inibição da síntese noradrenérgica (KALRA et al., 1972) quanto o bloqueio dos receptores adrenérgicos (LEE et al., 1997) e a lesão eletrolítica do núcleo noradrenérgico do Locus coeruleus (LC) (ANSELMO-FRANCI et al., 1997) resultam na supressão do aumento de LH em ratas. Foi observado também que o efeito resultante da NA é excitatório, pois sua injeção intracerebroventricular estimula a liberação de GnRH e LH em ratas OVX tratadas com estradiol (CHING & KRIEG, 1986). Isto evidencia a participação dos neurônios noradrenérgicos do LC na gênese dos picos pré-ovulatórios de GnRH/LH induzidos pelos esteroides ovarianos. Assim, sabe-se que os neurônios NA estão sob modulação esteroideal ovariana (JENNES et al., 1992; SZAWKA et al., 2009).

A crescente prevalência da obesidade em crianças e adultos, resulta em um ônus social e econômico para a sociedade se nenhuma intervenção eficaz for encontrada. Dessa forma, uma vez que a obesidade pode levar à antecipação da puberdade,

infertilidade e outros distúrbios reprodutivos; e que o método de redução de ninhada é capaz de induzir obesidade infantil nos animais, a qual perdura até a fase adulta, torna-se relevante avaliar os efeitos da obesidade induzida pela redução do tamanho da ninhada na regulação do eixo HHG e fertilidade em fêmeas na vida adulta.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar os efeitos da supernutrição induzida pela redução do tamanho da ninhada na regulação do eixo HHG e fertilidade em ratas da linhagem Wistar.

Objetivos específicos:

Avaliar em ratas de ninhadas normal (NL) e reduzida (SL) os seguintes parâmetros:

1. Validação do modelo: ganho de peso corporal, ingestão alimentar, peso de tecido adiposo branco visceral, Índice de Lee e distância ano-genital; parâmetros plasmáticos (glicose, triglicérides, colesterol total);
2. Instalação da puberdade e fertilidade: abertura vaginal, primeiro estro, regularização do ciclo estral, taxas de fertilidade;
3. Perfil hormonal: corticosterona, LH, estradiol, progesterona e testosterona;
4. Via Noradrenérgica-Kisspeptina-GnRH: expressão de RNAm de kisspeptina e GnRH na área pré-óptica do hipotálamo e tirosina hidroxilase (TH), enzima-chave para a síntese catecolaminas, no LC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais Experimentais

Por meio de cruzamento de 42 matrizes de ratos Wistar provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), foi obtida e utilizada a prole feminina. Durante o cruzamento foi mantida uma fêmea com cada macho. Quando foi observado espermatozoide durante o esfregaço vaginal houve a constatação da prenhez, e cada rata foi colocada em caixa individual. O dia de nascimento foi considerado dia pós-natal (DPN) 0. No DPN 3, foi feito o ajuste do tamanho da ninhada, e foram mantidos 3 filhotes, sendo 2 machos e 1 fêmea (ninhada pequena – SL) ou 10 filhotes, sendo 5 machos e 5 fêmeas (ninhada normal – NL) com cada mãe (RODRIGUES et al., 2009). Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. Os machos, tanto de NL quanto SL, foram utilizados para outro projeto. O modelo é considerado uma indução da supernutrição neonatal, uma vez que foi demonstrado que a redução no número de filhotes altera a quantidade e a qualidade do leite, o qual possui uma maior concentração de lipídios, especialmente triglicérides, o que aumenta a disponibilidade de nutrientes para os filhotes durante a amamentação (SHANKAR et al., 2008; ŠEFČIKOVÁ et al., 2011).

Os animais foram mantidos no laboratório setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas, em condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura (22 ± 2 °C), com água e ração “ad libitum”; exceto as horas de restrição alimentar antes do teste de tolerância à glicose (GTT) e eutanásia. Todos os experimentos foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas/UEL nos horários determinados em cada protocolo experimental. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais para experimentação (Número do protocolo 3457.2019.11, ANEXO).

3.2 Protocolos experimentais

3.2.1 Protocolo 1: Efeito da supernutrição induzida pela redução do tamanho da ninhada no peso corporal, ingestão alimentar, distância anogenital, índice de Lee, pesos do tecido adiposo branco, parâmetros metabólicos, desenvolvimento sexual e eixo tronco encefálico-hipotálamo-hipófise-gônadas.

Como pode ser visto na Figura 1, no DPN 3, quando a manipulação do tamanho da ninhada foi realizada para determinar NL e SL, os animais foram pesados e a distância anogenital foi medida. Os animais também foram pesados nos DPNs 7, 10, 14, 17 e 21. No DPN 21, dia do desmame, a distância anogenital também foi avaliada. Após o

desmame, os animais foram pesados a cada 5 dias, até o DPN 90. A partir do DPN 25, foi analisada a abertura vaginal e, após isso, o esfregaço vaginal foi coletado até a ocorrência do primeiro estro. A partir do DPN 75, o peso corporal e a ingestão alimentar foram avaliados diariamente, e o esfregaço vaginal foi novamente coletado para a análise da ciclicidade estral das fêmeas no período de 16 dias. A partir do DPN 90, quando em proestro, foram pesadas e fez-se a medida naso-anal, foram submetidas à restrição alimentar por 6 horas e à eutanásia por decapitação às 15 horas. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugado a 14.000xg por 20 minutos a 4°C para obtenção do plasma, que foi armazenado a -20 °C para análise bioquímica das concentrações plasmáticas de corticosterona, glicose, triglicérides, colesterol total, LH, estradiol, progesterona e testosterona. O útero, os ovários, as adrenais e o tecido adiposo visceral retroperitoneal e perirenal + perigonadal foram removidos e pesados. O encéfalo também foi removido e armazenado em freezer a -80 ° C para posterior análise molecular por PCR em tempo real.

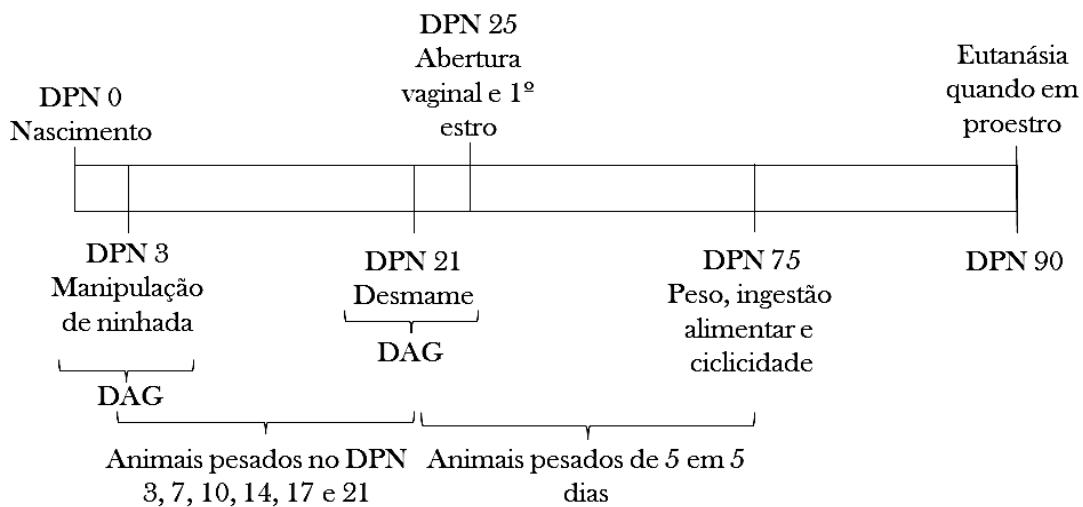


Figura 1. Delineamento experimental do Protocolo 1: manejo após nascimento para avaliação de parâmetros reprodutivos e metabólicos.

3.2.1.1 Distância anogenital normalizada

A DAG é utilizada como leitura de efeito em estudos de toxicidade de roedores, visando testar compostos para atividade endócrina e propriedades androgênicas/anti-androgênicas (SCHWARTZ et al., 2019). Para medir a distância anogenital (o comprimento do ânus ao tubérculo genital), um paquímetro foi utilizado. A medida foi dada em milímetros, e o índice anogenital foi calculado como a razão entre a distância anogenital e a raiz cúbica do peso corporal (GALLAVAN et al., 1999).

3.2.1.2 Desenvolvimento sexual: abertura vaginal e primeiro estro

A partir do DPN 25, a vagina foi observada diariamente até a ocorrência de sua abertura. Após a abertura vaginal, o esfregaço vaginal foi realizado até o primeiro estro, fase do ciclo estral caracterizada pela presença de maior proporção de células epiteliais cornificadas (DOS SANTOS et al., 2016).

3.2.1.3 Determinação do ciclo estral

Os esfregaços vaginais foram coletados diariamente às 8 horas da manhã para avaliar o ciclo estral. O esfregaço vaginal foi coletado e colocado em lâmina histológica, que foi analisado em microscópio óptico, com aumento de 10x para análise de proporções e tipos de células (células epiteliais cornificadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos). As fases do ciclo estral foram determinadas pelos seguintes critérios: no proestro houve predomínio de células epiteliais nucleadas, a fase do estro foi identificada pela presença de maior proporção de células epiteliais cornificadas, o metaestro (diestro I) foi caracterizado por células cornificadas e outras células nucleadas, já acompanhadas por um grande número de leucócitos, e o diestro (diestro II) foi identificado pela presença de células leucocitárias. A determinação do ciclo foi realizada durante 16 dias, do DPN 75 ao DPN 90. Foi calculado o coeficiente (%) da ocorrência de cada fase do ciclo. A eutanásia foi realizada na tarde em que a fêmea se encontrava em proestro, para análise dos parâmetros avaliados durante o feedback positivo induzidos pelos esteroides ovarianos.

3.2.1.4 Índice de Lee

Antes da eutanásia de cada animal, a partir do DPN 90 quando em proestro, o peso corporal e a medida naso-anal foram calculados dividindo a raiz cúbica do peso corporal em gramas pelo comprimento naso-anal em centímetros (BERNARDIS & PATTERSON, 1968).

3.2.1.5 Dosagem das concentrações plasmáticas de glicose, colesterol, triglicérides, corticosterona, LH, estradiol, progesterona e testosterona

Após a eutanásia por decapitação quando em proestro, o sangue foi coletado em tubos heparinizados. Após centrifugação a 2500 rpm e 4 °C por 20 minutos, o plasma foi aliquoteado e armazenado a -20 °C para dosagens posteriores de glicose, colesterol total, triglicérides, corticosterona, LH, estradiol, progesterona e testosterona. A espectrofotometria foi utilizada para as determinações das concentrações plasmáticas de glicose, triglicérides e colesterol (Kits comerciais, hemoglobina, PR), corticosterona

plasmática por fluorimetria (GUILLEMIN et al., 1958) e ensaio imunoenzimático (EIA) para a determinação do estradiol. (EIA 2693; DRG Instruments GmbH), progesterona (EIA 1561; DRG Instruments GmbH), LH (número de registro 80524900073; Bio Advance Diagnostics) e testosterona (EIA-1559; DRG Instruments GmbH) de acordo com as instruções do fabricante.

3.2.1.6 *Microdissecção, extração total de RNA e PCR em tempo real quantitativo*

Microdissecções da APO e LC foram obtidas utilizando-se agulhas de *punch* inoxidável 1,5 e 0,5 mm, respectivamente, de diâmetro a partir de cortes coronais (1200 μ m), em criostato de acordo com as coordenadas de -0,40 a -0.80 mm para APO e 9,4 a 19,8 mm para LC, de bregma, segundo atlas de Paxino e Watson, 1993. O RNA total foi isolado a partir de cada amostra de tecido coletado na microdissecção utilizando o reagente Trizol (Invitrogen®, New Zealand) de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração de RNA em cada amostra foi quantificada utilizando leitor de micro placas de detecção múltipla (Synergy HT, BioTek) e foram utilizados 250 ng de RNA para a síntese de cDNA utilizando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, EUA). As reações foram realizadas em volume de 12 μ L (4 μ L de cDNA), utilizando reagentes TaqMan® (Applied Biosystems). Cada reação de PCR foi realizada em duplicata, sendo a água o controle negativo. A beta-actina foi utilizada como gene de referência (controle endógeno), o qual ocorreu com cada amostra de cDNA. A determinação das concentrações de genes transcritos em cada amostra foi obtida pelo método $\Delta\Delta$ CT. Para cada amostra, o ciclo limiar (Ct) foi determinado e normalizado com a média do gene de referência (Δ Ct=Ct_{amostra}-Ct_{genedereferência}). A variação da expressão de RNAm nas amostras em relação ao grupo controle foi calculada como $2^{-\Delta\Delta$ Ct}, em que $\Delta\Delta$ Ct= Δ Ct_{amostra}- Δ Ct_{controle} (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Desta forma, o resultado obtido representa a expressão relativa de RNAm do gene de interesse.

3.2.2 *Protocolo 2: Efeito da supernutrição induzida pela redução do tamanho da ninhada na regularização do ciclo estral após a puberdade, Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e fertilidade.*

Assim como no protocolo anterior, no DPN 3 os animais foram agrupados em NL e SL e no DPN 21 ocorreu o desmame. A partir do DPN 25, foi observada a abertura vaginal, e então o esfregaço vaginal foi coletado diariamente para avaliar o tempo de regularização do ciclo estral. No DPN 70, as ratas foram submetidas a seis horas de restrição alimentar e o GTT foi realizado. A partir do DPN 90, as fêmeas foram colocadas

para acasalar com rato macho controle e sexualmente experiente. No dia seguinte, quando a gravidez foi confirmada, foi considerado o dia gestacional (GD) 0, e cada fêmea foi colocada em uma gaiola individual. O dia de nascimento da ninhada foi considerado dia lactacional (DL) 0 e após o desmame dos filhotes no DL 21, as mães foram submetidas à eutanásia para análise de fertilidade. As mães não foram submetidas à eutanásia logo após o nascimento dos filhotes, pois essa prole foi utilizada para outro projeto (Figura 2).

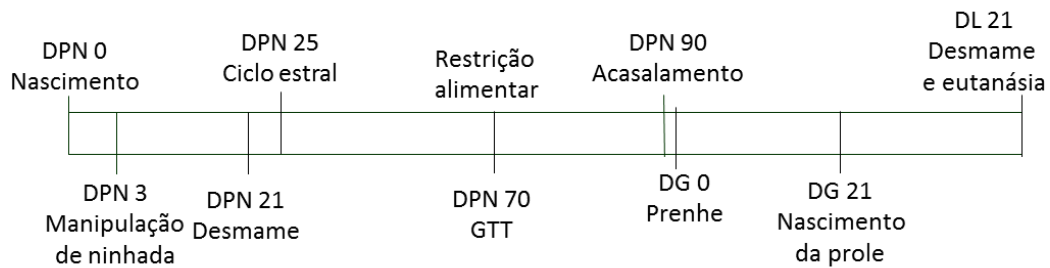


Figura 2. Delineamento experimental do Protocolo 2.

3.2.2.1 Determinação do ciclo estral

A determinação do ciclo estral foi feita como descrito no item 3.2.1.3. Após a identificação do primeiro estro, manteve-se a avaliação até que o mesmo fosse regular por duas vezes seguidas, então se considerou o momento de regularização. Também foi calculado o coeficiente de cada uma das fases do ciclo, além da duração deste. O cálculo destes coeficientes consiste em dividir o número de vezes que a fêmea foi diagnosticada em determinada fase pela quantidade de dias avaliados, multiplicado por 100. Para o cálculo da duração do ciclo divide-se a quantidade de dias avaliados pela quantidade de dias que a fêmea foi diagnosticada em proestro.

3.2.2.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)

O teste de GTT está ilustrado na Figura 3. No DPN 70, os animais tiveram a ração removida às 8 horas da manhã, e às 14 horas, uma gota de sangue da cauda foi coletada para a determinação da glicemia basal utilizando a fita teste do Accu-Check Advantage II (Roche, Taquara, RJ, Brasil) e um dispositivo para determinação de glicemia. Em seguida, foi realizada a administração oral (gavagem) de glicose (1,0 g/kg de peso corporal) na concentração de 25%, e as medidas de glicemia foram realizadas pela tira de teste 15, 30, 60 e 120 min após sobrecarga de glicose. A ração foi recolocada nas gaiolas ao final do GTT.

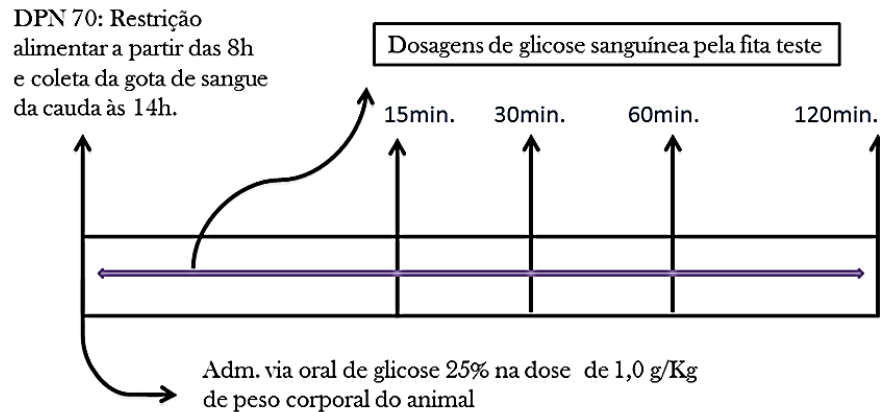


Figura 3. Delineamento experimental do GTT.

3.2.2.3 Análise de fertilidade

Após o desmame dos filhotes no DPN 21, as fêmeas foram submetidas à eutanásia por decapitação e, em seguida, foi feita uma incisão longitudinal na parede abdominal para visualização dos cornos uterinos, que foram retirados para fazer a determinação do número de implantações uterinas. Além disso, os ovários foram retirados para a separação e contagem dos corpos lúteos. A partir da contagem dos pontos implantações, dos corpos lúteos e fetos vivos, foram determinados os parâmetros abaixo:

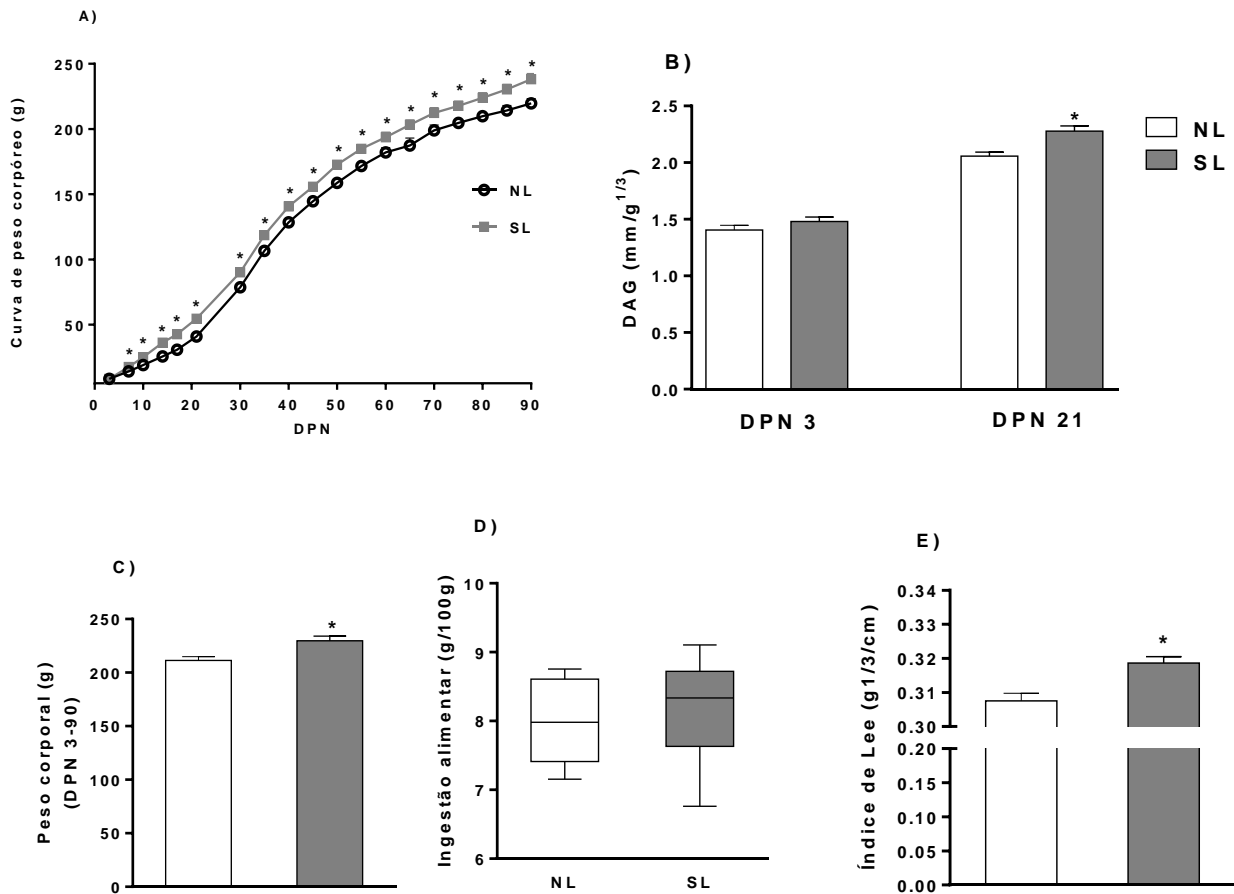
- Taxa de implantação = $(\text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação} / \text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100$;
- Taxa de perda pré-implantação = $[(\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação}) / \text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}] \times 100$;
- Taxa de perda pós-implantação = $[(\text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos no DL1}) / \text{n}^\circ \text{ de implantações}] \times 100$;
- Taxa de Viabilidade Fetal = $(\text{n}^\circ \text{ de fetos vivos no DL1} / \text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação}) \times 100$.

3.3 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e os dados foram analisados pelo teste t, e teste de Mann-Whitney, quando apropriado. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) para o teste t, e como mediana (1^o-3^o intervalo interquartil) para o teste de Mann-Whitney. Diferenças foram consideradas significantes quando $P < 0,05$.

4. Resultados

Os resultados obtidos mostram que a redução do tamanho da ninhada é capaz de aumentar o peso corporal das fêmeas ($P < 0,05$), quando comparado às ratas de ninhada normal (Figura 4A). Observou-se também que, no DPN 21, a distância anogenital foi maior ($P < 0,05$) nas fêmeas SL em relação às NL (Figura 4B), e a variação do peso corporal no DPN 3 a 90 foi maior no grupo SL ($P < 0,05$) (Figura 4C). Embora o peso corporal tenha sido maior em ratas SL, não houve diferença na ingestão de alimentos entre os grupos (Figura 4D). O grupo SL também apresentou maior índice de Lee que os animais controle ($P < 0,05$) (Figura 4E), bem como aumento ($p < 0,05$) do peso dos tecidos perigonais + adiposo perirrenal e retroperitoneal (Figura 4F e 4G).



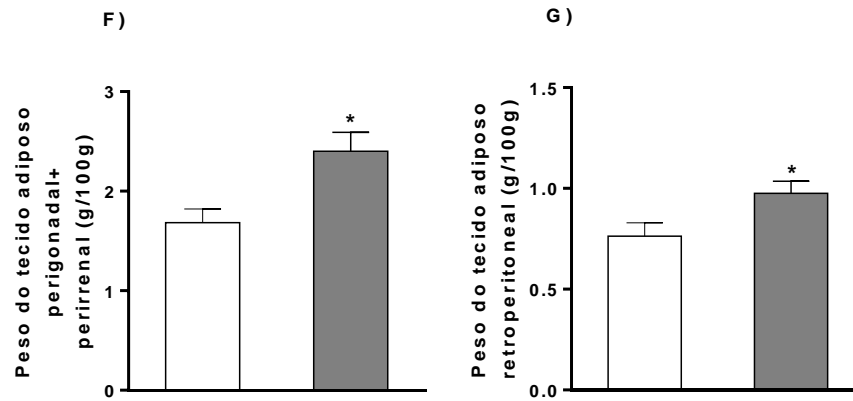
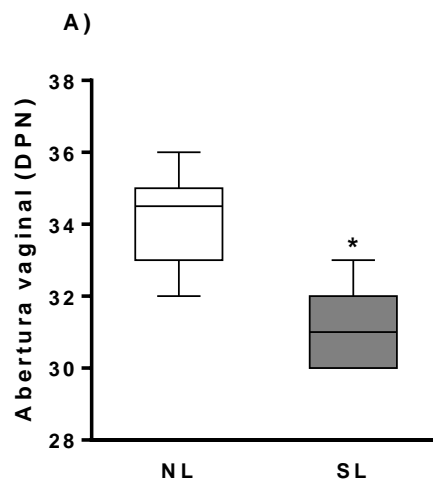


Figura 4. Curva de peso corpóreo (g) (A), Distância anogenital ($\text{mm/g}^{1/3}$) (B), Peso corporal (g) (C), Ingestão alimentar ($\text{g}/100\text{g}$) (D), Índice de Lee ($\text{g}^{1/3}/\text{cm}$) (E), Peso do tecido adiposo perigonadal+perirrenal ($\text{g}/100\text{g}$) (F) e Peso do tecido adiposo retroperitoneal ($\text{g}/100\text{g}$) (G) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como média \pm EPM, para teste t, e mediana (1° - 3° intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ ($n=18$).

Pode ser observado na Figura 5A e 5B que tanto a abertura vaginal quanto o primeiro estro de ratas SL ocorreram mais cedo ($P < 0,05$) do que o grupo NL, respectivamente. Após o primeiro estro, as fêmeas SL apresentaram ciclo estral regulado mais tardiamente que os animais NL (Figura 5C). Avaliando-se o coeficiente das fases do ciclo estral em 16 dias, é possível observar que não houve diferença no coeficiente do proestro, mas o coeficiente de estro foi menor ($p < 0,05$) em SL, e de diestro I e II foi maior ($p < 0,05$) no grupo experimental. Além disso, não houve diferença na duração do ciclo entre os grupos (Tabela 1).



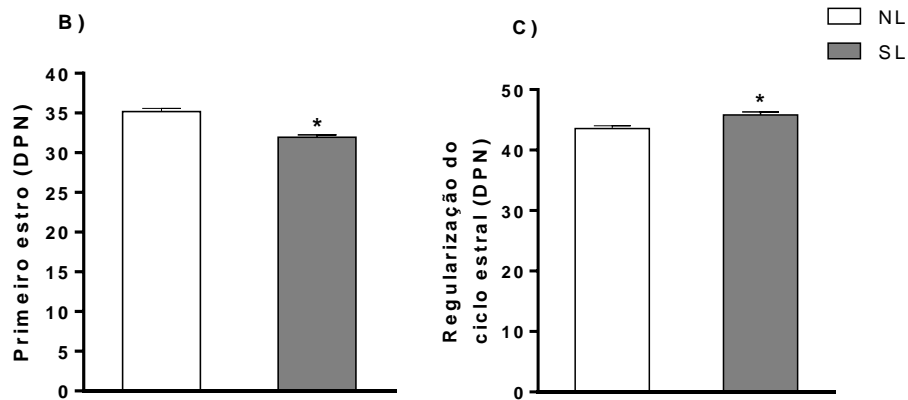


Figura 5. Abertura vaginal (DPN) (A), Primeiro estro (DPN) (B), Regularização do ciclo estral (DPN) (C) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como média \pm EPM, para teste t, e mediana (1^o-3^o intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ (n=18).

Grupos	Coefficiente de proestro (%)	Coefficiente de estro (%)	Coefficiente de diestro I e II (%)	Duração do ciclo
NL	18,8 (12,5-25)	31,3 (25-37,5)	50 (42,2-57,8)	5,3 (4-8)
SL	21,9 (17,2-25)	25 (18,8-26,6)*	56,2 (50-56,3)*	4,7 (4-6)

Tabela 1. Avaliação do ciclo estral durante 16 dias. Dados expressos como mediana (1^o-3^o intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$.

A redução do tamanho da ninhada não alterou as concentrações plasmáticas de glicose (Figura 6A), triglicérides (Figura 6B) e colesterol total (Figura 6C), comparado ao grupo controle. A concentração de corticosterona foi significativamente maior no grupo SL ($p < 0,05$) (Figura 6D). O GTT realizado no DPN 70 mostrou que o grupo SL obteve glicemia maior 30, 60 e 120 minutos após a sobrecarga oral de glicose (Figura 6E), e essa resposta do GTT integrada na área sob a curva (AUC) do GTT mostrou aumento da AUC do GTT no grupo SL, comparado aos animais NL ($P < 0,05$) (Figura 6F).

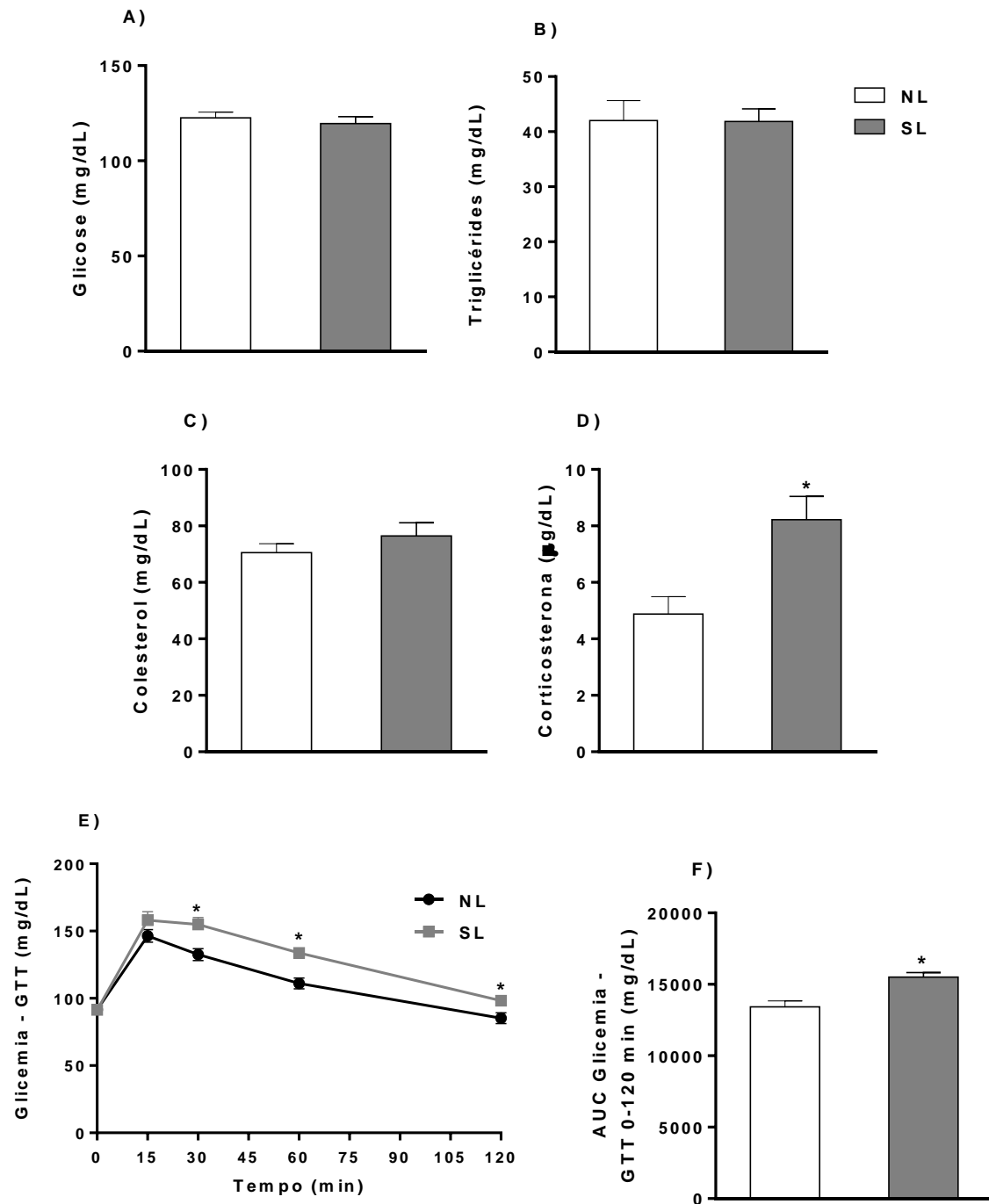


Figura 6. Concentração plasmática de glicose (mg/dL) (A), triglicérides (mg/dL) (B), colesterol (mg/dL) (C), corticosterona (ug/dL) (D), teste de tolerância à glicose (GTT) (E) e área sob curva (AUC) do GTT (F) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Teste t. Dados expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ ($n=9$).

A expressão relativa do RNAm de GnRH e Kisspeptina na APO foi menor ($P < 0,05$) nos animais SL do que no grupo NL (Figura 7A e 7B). Da mesma forma, a expressão de RNAm de TH no LC foi diminuída ($P < 0,05$) pela redução do tamanho da ninhada (Figura 7C). Não houve diferença estatística nas concentrações plasmáticas de LH entre os grupos SL e NL (Figura 8A). Pode-se observar (Figura 8B) que a concentração plasmática de estradiol foi reduzida nos animais SL, em comparação ao controle ($p < 0,05$), enquanto as concentrações plasmáticas de progesterona e testosterona não diferiram entre os grupos (Figura 8C e 8D).

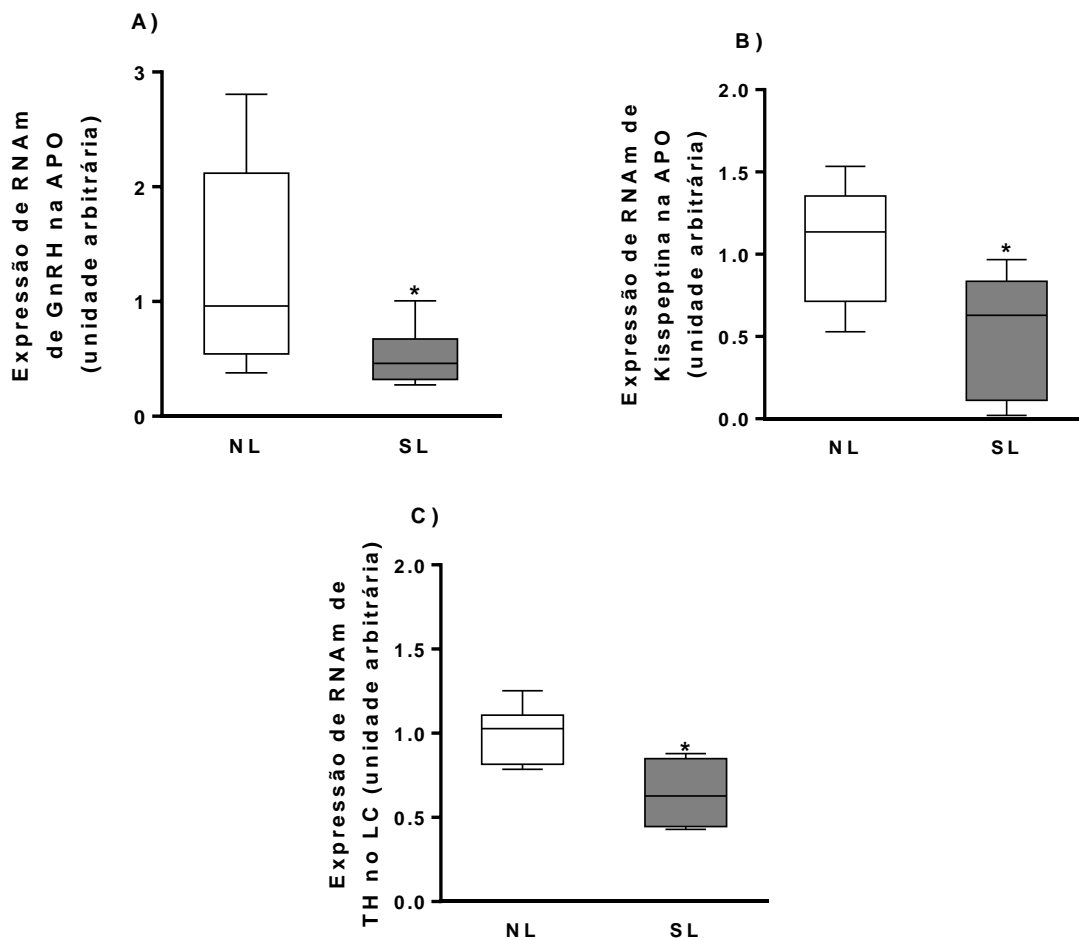


Figura 7. Expressão de RNAm de GnRH na APO (A), Expressão de RNAm de Kisspeptin na APO (B), Expressão de RNAm de TH no LC (C) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como mediana (1° - 3° intervalo interquartil) no teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ ($n=5-8$).

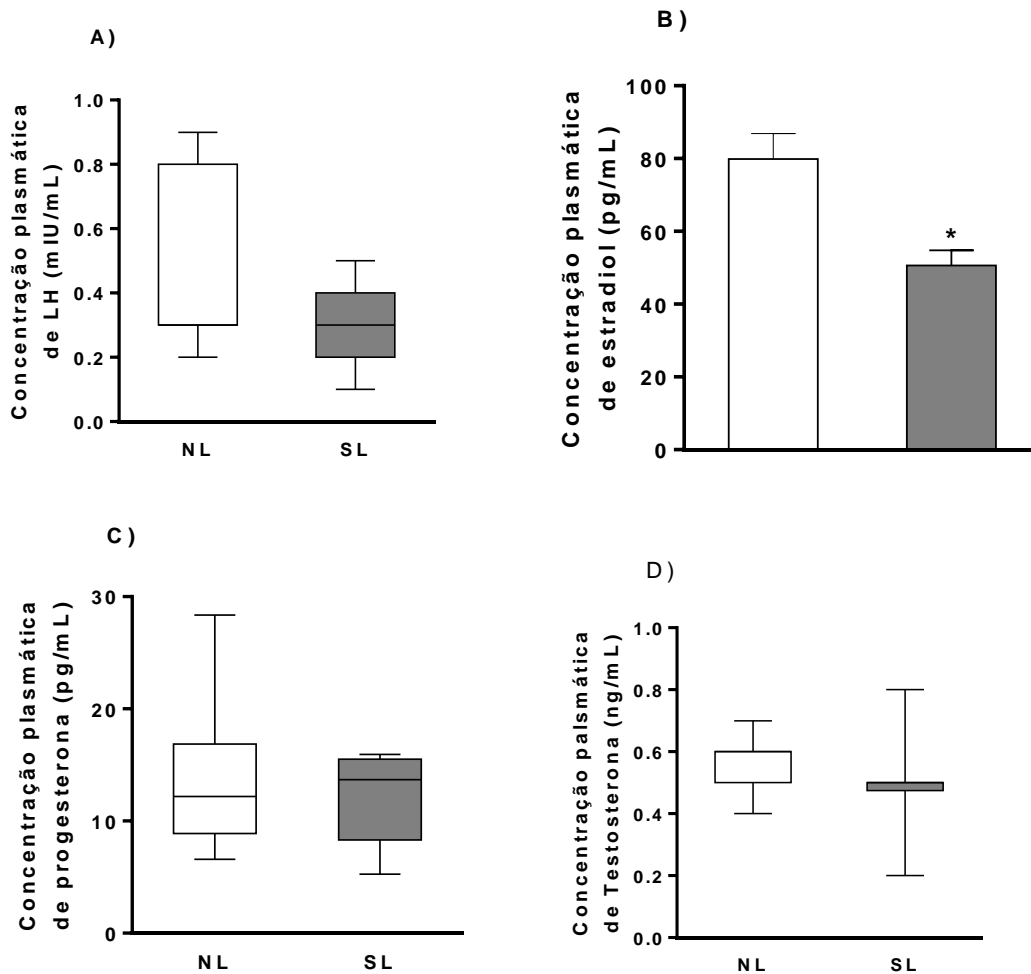


Figura 8. Concentrações plasmáticas de LH (mIU/mL) (A), estradiol (pg/mL) (B), progesterona (pg/mL) (C) e testosterona (ng/mL) de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos como média \pm EPM, para teste t, e mediana (1^o-3^o intervalo interquartil), para teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ (n=9).

Após a prenhez, foi possível determinar que a taxa de implantação foi menor ($P < 0,05$) e as taxas de perda pré-implantação e perda pós-implantação foram maiores ($P < 0,05$) no grupo SL. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos na viabilidade fetal, no número de corpos lúteos e de fetos vivos no DL1 (Tabela 2). A Tabela 3 mostra os pesos relativos (mg/100g) da glândula adrenal, ovários e útero das fêmeas, mas não houve diferença significativa entre os órgãos de SL em relação ao controle.

Grupos	Taxa de implantação (%)	Taxa de perda pré-impantação (%)	Taxa de perda pós-impantação (%)	Taxa de viabilidade fetal (%)	Número de corpos lúteos	Número de fetos vivos no DL1
NL	85,7 (77,8 - 92,9)	14,3 (7,1- 22,2)	7,7 (0-13,3)	92,3 (86,7- 100)	15 (14-18)	12,55 ± 0,4
SL	76,8 (68 - 87,5)*	21,4 (12,5 - 32)*	9,1 (6,9- 19,2)*	90,9 (80,8- 93,1)	17 (15,5- 18,5)	11,5 ± 0,7

Tabela 2. Taxas de fertilidade de animais de ninhada normal (NL) e reduzida (SL). Dados expressos em média ± EPM (teste t) ou mediana (1^o-3^o intervalo interquartil) (teste de Mann-Whitney). *P<0,05 (n=11-17).

Grupo	Peso das adrenais (mg/100g)	Peso dos ovários (mg/100g)	Peso do útero (mg/100g)
NL	16,5 ± 0,7	26,2 ± 0,9	203,2 ± 13,0
SL	17,4 ± 0,8	25,3 ± 0,8	196,8 ± 14,7

Tabela 3. Peso das glândulas adrenais (mg/100g), peso dos ovários (mg/100g) e peso do útero (mg/100g) de NL e SL. Dados expressos em média ± EPM. *P<0,05 (n=12-16).

5. Discussão

O presente estudo é pioneiro em demonstrar que a obesidade induzida por supernutrição neonatal prejudica a reprodução em ratas adultas, evidenciada pela diminuição da fertilidade associada à redução nas concentrações plasmáticas de estradiol e menor expressão de RNAm de GnRH e Kisspeptina na LC e TH no LC, na tarde de proestro. Embora diferentes estudos tenham mostrado que a obesidade induzida por supernutrição neonatal afeta parâmetros reprodutivos na puberdade, existem poucos estudos que avaliaram as funções reprodutivas na idade adulta de ratas neste modelo.

Validando o modelo utilizado, a curva de peso corporal elevada desde o pré-desmame até a idade adulta em ratas de ninhada reduzida, observada no presente trabalho, também foi evidenciada anteriormente, uma vez que o peso corporal foi

significativamente maior em animais SL, comparado com a ninhada normal, e o aumento significativo do peso corporal persistiu na idade adulta (STEFANIDIS & SPENCER, 2012; WANG et al., 2015; WU et al., 2016). A obesidade induzida por supernutrição neonatal em ratas adultas foi evidenciada pelo aumento do índice de Lee e do peso dos tecidos adiposos brancos viscerais, o que também foi demonstrado por outros estudos (WANG et al., 2015; ENES-MARQUES & GIUSTI-PAIVA, 2018). Foi demonstrado anteriormente que a redução no número de filhotes altera a quantidade e a qualidade do leite, levando a uma maior produção de lipídios, especialmente triglicérides, o que aumenta a disponibilidade de nutrientes para os filhotes durante a amamentação (SHANKAR et al., 2008; ŠEFČIKOVÁ et al., 2011). Assim, tanto o aumento da disponibilidade de leite quanto a maior quantidade de lipídios no leite no período neonatal podem ser a causa do aumento de peso corporal e depósitos de tecido adiposo em animais SL.

A intolerância à glicose observada em ratos SL no presente trabalho, também previamente demonstrada em ratos machos e fêmeas SL (MARQUES, 2014), pode ser atribuída a concentrações mais elevadas de corticosterona plasmática em ratas com obesidade induzida por redução de ninhada, uma vez que se sabe que intolerância à glicose induzida por corticosterona resulta da redução da captação periférica de glicose (NOSADINI et al., 1983; BLOCK & BUSE, 1989; DIMITRIADIS, 1997). De fato, foi evidenciado que ratos de ninhada reduzida apresentam um aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Embora os dados da literatura apontem a dislipidemia em animais SL, observada por concentrações mais elevadas de colesterol e triglicérides nesses animais, não foram observadas alterações plasmáticas de colesterol e triglicérides no presente estudo. Isso pode ser decorrente dos experimentos terem sido realizados em fêmeas, e os estudos relatados da literatura foram feitos em machos (NASCIMENTO et al., 2008; RINALDI et al., 2012), além de serem avaliados em ratos e camundongos provenientes de ninhadas de 4 (SL) ou 14 (NL) filhotes por mãe. (HAHN et al., 1984).

Tem sido demonstrado que, em mulheres, uma DAG maior é considerada um efeito de masculinização, como resultado de concentrações plasmáticas elevadas de andrógenos (MIRA-ESCOLANO et al., 2014; WU et al., 2017; BARRETT et al., 2018), o que foi reforçada por estudos realizados em ratas (OSTBY & GRAY, 2004; HOTCHKISS et al., 2007; RAMEZANI et al., 2014). Contudo, os estrogênios também podem causar maior DAG nas fêmeas, como observado que, embora a exposição fetal ao etinilestradiol não afete a DAG em ratos machos, a prole feminina pode apresentar uma DAG mais

longa após exposição a doses suprafisiológicas de estradiol (CASANOVA et al., 1999; DELCLOS et al., 2009). Assim, sugere-se que a maior DAG em ratas observada neste trabalho possa ser atribuída a ações andrógenas e estrogênicas durante a infância.

O início precoce da puberdade, induzido pela obesidade, foi confirmado em fêmeas SL, que mostraram adiantamento significativo dos dias de abertura vaginal e primeiro estro. De fato, uma forte correlação entre o peso corporal e a idade na abertura vaginal foi previamente observada (SMITH, 2012; CASTELLANO et al., 2011), assim como o início da puberdade foi intimamente correlacionado com a nutrição pré-desmame e o ganho de peso corporal (AHMED et al., 2009; WU et al., 2016). Além disso, a supernutrição neonatal também afetou a maturação puberal, visto que as ratas SL tiveram um atraso no início da ciclicidade regular. Adicionalmente, apesar de não ter sido observado alterações no número de ciclos regulares na vida adulta, a disfunção na ciclicidade foi evidenciada pela diferença significativa do coeficiente nas fases de estro e diestro I e II do ciclo estral entre ratas controle e com obesidade. De acordo com isso, foi demonstrado anteriormente que a maioria dos ratos NL (66,4%) tinha um ciclo estral típico de 4 a 5 dias na puberdade, e esse percentual aumentou para 77,8% na idade adulta. Enquanto em ratos SL, apenas 35% tinham ciclicidade normal na puberdade, o que melhorou para 65% na idade adulta, evidenciando que o ciclo estral regular foi significativamente menor na puberdade do grupo SL (WU et al., 2016).

Os resultados deste trabalho podem ser corroborados por relatos anteriores que mostraram que a obesidade induzida por dieta diminuiu a expressão de RNAm de GnRH no hipotálamo em camundongos fêmeas (TORTORIELLO et al., 2004), enquanto que ratas fêmeas adultas com obesidade induzida por supernutrição neonatal também tiveram valores mais baixos de estradiol circulante, sem alterações nas concentrações plasmáticas de LH e progesterona (SÁNCHEZ-GARRIDO et al., 2015). A falta de evidências do receptor de estrogênio e progesterona nos neurônios do GnRH motivou a busca por mediadores de esteroides ovarianos no feedback dos neurônios do GnRH ao longo do ciclo reprodutivo. Neste contexto, os neurônios kisspeptina na APO e ARC têm sido apontados como um dos principais interneurônios mediando o feedback de estradiol e progesterona sobre os neurônios GnRH, e conseqüentemente sobre as gonadotrofinas LH e FSH (DHILLO et al., 2005; HASHIZUME et al., 2010). Em vista disso, a expressão de mRNA da kisspeptina na APO também foi avaliada em ratas de ninhada normal e reduzida, e os dados obtidos mostram que, de forma semelhante aos dados de estradiol e GnRH, as ratas SL na idade adulta também exibiram uma quantidade reduzida de

transcrição de kisspeptina na APO. De fato, a supernutrição pós-natal está associada a níveis aumentados de expressão de mRNA de kisspeptina hipotalâmica na puberdade e Sánchez-Garrido et al. (2015) relataram que ratas adultas de ninhadas reduzidas e alimentadas com dieta rica em lipídeos apresentaram expressão mais baixa e alta de mRNA de kisspeptina no ARC e APO, respectivamente. No entanto, não houve relato até o momento do efeito da redução do tamanho da ninhada, por si só, na expressão de kisspeptina no hipotálamo de ratos adultos.

Está bem estabelecido que a kisspeptina desempenha um papel crucial na regulação da secreção de GnRH e, conseqüentemente, LH e FSH (DHILLO et al., 2005; HASHIZUME et al., 2010; PATTERSON et al., 2008). Conseqüentemente, o tratamento intracerebroventricular com kisspeptina provocou a secreção de LH e FSH, através da mediação de GnRH (NAVARRO et al., 2005a, 2005b). Além disso, a administração intracerebroventricular crônica do antagonista do receptor da kisspeptina impediu a ocorrência dos picos pré-ovulatórios de LH e FSH (PINEDA et al., 2014). Curiosamente, os neurônios kisspeptina na APO têm sido apontados como um nó central no feedback positivo do estradiol e da progesterona nos neurônios do GnRH para desencadear o aumento do LH (OAKLEY et al., 2009; HERBISON, 2005; LEITE et al., 2016). Assim, é provável que a superalimentação perinatal perturbe o feedback positivo induzido pelo estradiol na via da kisspeptina-GnRH, como observado pelas concentrações reduzidas de estradiol plasmático relacionados com a menor expressão de kisspeptina e mRNA de GnRH na APO de ratas fêmeas SL na tarde de proestro.

Além da kisspeptina, foi evidenciado que o envolvimento do neurônio NA de LC nos picos pré-ovulatórios de GnRH-LH (HERBISON, 1997; ANSELMO-FRANCI et al., 1997) e o aumento da liberação de NA na APO no momento do pico de LH é consistente com a ativação da APO por estradiol durante o feedback positivo (DEMLING et al., 1985). Nesse sentido, a expressão do RNAm da enzima chave para a síntese de catecolaminas também foi analisada em ratas do modelo de manipulação do tamanho da ninhada, e tais resultados mostraram que, de forma semelhante às concentrações plasmáticas de estradiol, à transcrição dos genes de kisspeptina e GnRH, a redução do tamanho da ninhada resultou na diminuição da expressão de mRNA do TH no LC de ratas adultas.

Dentro desse contexto o estudo de Kalil et al. (2016) relatou que o antagonismo do receptor 1-adrenérgico global bloqueou a liberação de GnRH induzida por estradiol na eminência mediana, comprometendo a síntese de kisspeptina na APO. Portanto, a

diminuição na concentração plasmática de estradiol em associação com expressão reduzida de transcritos TH no LC e kisspeptina e GnRH na APO na tarde de proestro de ratas adultas com obesidade induzida por supernutrição neonatal sugerem que a programação metabólica pós-natal pode causar disfunções no feedback positivo de estradiol sobre cascata de kisspeptina-GnRH na idade adulta.

Além da via NA-kisspeptina-GnRH, a diminuição da fertilidade, evidenciada por menor taxa de implantação e maiores taxas de perda pré-implantação e pós-implantação em ratas SL, também pode estar relacionada com concentrações mais baixas de estradiol no plasma, uma vez que infertilidade em diferentes modelos tem sido associada com hipoestrogenemia e hiperandrogenemia (CARVALHO et al., 2014; CARPINELLO et al., 2017). No entanto, a falta de diferença nas concentrações plasmáticas de testosterona entre ratas NL e SL sugere que a infertilidade das ratas com obesidade do presente estudo não esteja relacionada com alterações de testosterona circulante. Além disso, outros fatores, como alterações na expressão gênica, baixa qualidade oocitária, bem como alterações nos embriões e no útero, também podem contribuir para diminuir a fertilidade no modelo obeso (ROBKER, 2008; ROBKER et al., 2009). Finalmente, a falta de diferenças no peso dos ovários e do útero e no número de corpos lúteos entre ratas criadas em ninhada normal e reduzida é reforçada por dados da literatura em ratos, seja na puberdade ou na idade adulta (WU et al., 2016).

O presente estudo mostrou que ratas provenientes de ninhadas pequenas apresentaram alterações metabólicas como intolerância à glicose, maior peso corporal, adiposidade, índice de Lee e concentrações plasmáticas de corticosterona, em associação com disfunções reprodutivas, comprovadas pela abertura vaginal e primeiro estro precoces, regularização do ciclo estral mais tardiamente, desregulação do ciclo estral, bem como menor fertilidade relacionada com concentrações plasmáticas reduzidas de estradiol, menor expressão de mRNA de TH no LC e kisspeptina e GnRH na APO em fêmeas adultas na tarde de proestro.

6. Conclusão

Estes resultados indicam que a obesidade induzida por supernutrição neonatal em ratas promove disfunções reprodutivas não apenas na puberdade, como relatado anteriormente, mas também na idade adulta, sendo esta uma nova evidência na literatura,

com comprometimento da fertilidade e do feedback positivo induzido pelo estradiol na via da NA-kisspeptina-GnRH.

7. Referências

- AHMED ML, ONG KK, DUNGER DB. *Childhood obesity and the timing of puberty*. Trends Endocrinol Metab. 2009;20:237–42.
- ANSELMO-FRANCI JA, FRANCI CR, KRULICH L, ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM. *Locus coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge*. Brain Res. 1997;767:289–296.
- BABICKY A, OSTADALOVA I, PARIZEK J, KOLAR J, BIBR B. *Onset and duration of the physiological weaning period for infant rats reared in nests of different sizes*. Physiologia Bohemoslovaca, 1973;22: 449 – 456.
- BARKER DJ. *In utero programming of chronic disease*. Clinical Science Journal. 1998;2: 115-28.
- BARRETT ES, HOEGER KM, SATHYANARAYANA S, ABBOTT DH, REDMON JB, NGUYEN RHN, SWAN SH. *Anogenital distance in newborn daughters of women with polycystic ovary syndrome indicates fetal testosterone exposure*. J Dev Orig Health Dis. 2018;9:307–314.
- BASSET DR, CRAIG BW. *Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats*. Journal of Applied Physiology. 1988;64:1249 – 1256.
- BELCHETZ PE, PLANT TM, NAKAI Y, KEOGH EJ, KNOBIL E. *Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone*. Science. 1978;202: 631–633.
- BERNARDIS LL, PATTERSON BD. *Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions*. J Endocrinol 1968;40:527-528.
- BLOCK NE, BUSE MG. *Effects of hypercortisolemia and diabetes on skeletal muscle insulin receptor function in vitro and in vivo*, Am. J. Physiol. 1989;256:39-48.
- BOULLU-CIOCCA S, DUTOUR A, GUILLAUME V, ACHARD V, OLIVER C, GRINO M. *Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome*. Diabetes ,2005;54:197–203
- CARVALHO ALO, FERRI BG, DE SOUSA FAL, VILELA FC, GIUSTI-PAIVA A. *Early life overnutrition induced by litter size manipulation decreases social play behavior in adolescent male rats*, The International Journal of Developmental Neuroscience. 2016;53:75-82.
- CARPINELLO OJ, SUNDHEIMER LW, ALFORD CE, TAYLOR RN, DECHERNEY AH. *Endometriosis*. Endotext. South Dartmouth (MA) 2017:2000.
- CARVALHO BR, RODRIGUES JK, CAMPOS JR, MARINHO RM, CAETANO JPJ. *An overview of female fertility preservation after cancer*, J Reprod & Clim 2014;29:123-129.

- CASANOVA M, YOU L, GAIDO KW, ARCHIBEGUE-ENGLE S, JANSZEN DB, HECK HA. *Developmental effects of dietary phytoestrogens in Sprague-Dawley rats and interactions of genistein and daidzein with rat estrogen receptors alpha and beta in vitro*. *Toxicol Sci* 1999;51:236–244.
- CASTELLANO JM, BENTSEN AH, SÁNCHEZ-GARRIDO MA, RUIZ-PINO F, ROMERO M, GARCIA-GALIANO D, AGUILAR E, PINILLA L, DIÉGUEZ C, MIKKELSEN JD, TENA-SEMPERE M. *Early Metabolic Programming of Puberty Onset: Impact of Changes in Postnatal Feeding and Rearing Conditions on the Timing of Puberty and Development of the Hypothalamic Kisspeptin System*. *Endocrinol* 2011;152:3396-3408.
- CHOI JH, YOO HW. *Control of puberty: genetics, endocrinology, and environment*. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*. 2013;20:62-68.
- DE BOO H.A, HARDING JE. *The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis*. *Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology*, 2006;46:4-14.
- DELCLOS KB, WEIS CC, BUCCI TJ, OLSON G, MELLICK P, SADOVOVA N, LATENDRESSE JR, THORN B, NEWBOLD RR. *Overlapping but distinct effects of genistein and ethinyl estradiol (EE(2)) in female Sprague-Dawley rats in multigenerational reproductive and chronic toxicity studies*. *Reprod Toxicol*. 2009;27:117–132.
- DELLO RM, AHRENS W, DE VRIENDT T, MARILD S, MOLNAR D, MORENO LA, REESKE A, VEIDEBaum T, KOURIDES YA, BARBA G, SIANI A, CONSORTIUM I. *Gestational weight gain and adiposity, fat distribution, metabolic profile, and blood pressure in offspring: the IDEFICS project*. *International Journal of Obesity*. 2013;37: 914–919.
- DEMLING J, FUCHS E, BAUMERT M, WUTTKE W. *Preoptic catecholamine, GABA, and glutamate release in ovariectomized and ovariectomized estrogen-primed rats utilizing a push-pull cannula technique*. *J Neuroendocrinol* 1985;41:212–218.
- DHILLO WS, CHAUDHRI OB, PATTERSON M, THOMPSON EL, MURPHY KG. *Kisspeptin-54 Stimulates the Hypothalamic-Pituitary Gonadal Axis in Human Males*. *J Clin Endocrinol & Metab* 2005;90:6609-6615.
- DIMITRIADIS G, LEIGHTON B, PARRY-BILLINGS M, SASSON S, YOUNG M, KRAUSE U, BEVAN S, PIVA T, WEGENER G, NEWSHOLME EA. *Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle*, *Biochem J* 1997;321:707-712.
- DOS SANTOS AH, VIEIRA ML, DE AZEVEDO CAMIN N, ANSELMO-FRANCI JA, CERAVOLO GS, PELOSI GG, MOREIRA EG, KISS AC, MESQUITA S DE F, GERARDIN DC. *In utero and lactational exposure to fluoxetine delays puberty onset in female rats offspring*. *Reprod Toxicol* 2016;62:1-8.
- ENES-MARQUES S, GIUSTI-PAIVA A. *Litter size reduction accentuates maternal care and alters behavioral and physiological phenotypes in rat adult offspring*. *J Physiol Sci* 2018;68:789-798.
- FRISCH RE, HEGSTED DM, YOSHINAGA K. *Body weight and food intake at early estrus of rats on a high-fat diet*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975;72:4172–4176.

- GALLAVAN RH JR, HOLSON JF, STUMP DG, KNAPP JF, REYNOLDS VL. *Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights.* *Reprod Toxicol.* 1999;13:383-90.
- GUILLEMIN R, CLAYTON GW, SMITH JD, LIPSCOMB HS. *Measurement of free corticosteroids in rat plasma: physiological validation of a method.* *Endocrinol.* 1958;63:349-358.
- GOODMAN RL. *The site of the positive feedback action of estradiol in the rat.* *Endocrinology.* 1978;102:151-159.
- HAHN P. *Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents.* *J Nutr* 1984;114:1231-4.
- HAN SK, GOTTSCH ML, LEE KJ. *Activation of gonadotropin-releasing hormone neurons by kisspeptin as a neuroendocrine switch for the onset of puberty.* *J Neuroscience.* 2005;25:11349–11356.
- HASHIZUME T, SAITO H, SAWADA T, YAEGASHI T, AHMED A, SAWAI K, YAMASHITA T. *Characteristics of stimulation of gonadotropin secretion by kisspeptin-10 in female goats.* *An Reprod Sci* 2010;118:37-41.
- HAYWOOD SA, SIMONIAN SX, VAN DER BEEK EM, BICKNELL RJ, HERBISON AE. *Fluctuating Estrogen and Progesterone Receptor Expression in Brainstem Norepinephrine Neurons through the Rat Estrous Cycle.* *Endocrinol.* 1999;140:3255–3263.
- HERBISON AE, THEODOSIS DT. *Localization of estrogen receptors in preoptic neurons containing neurotensin but not tyrosine hydroxylase, cholecystokinin or luteinizing hormone-releasing hormone in the male and female rat.* *Neurosci* 1992;50:283–298.
- HERBISON AE. *Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion.* *Rev of Reprod* 1997;2:1– 6.
- HERBISON AE. *Estrogen positive feedback to gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons in the rodent: the case for the rostral periventricular area of the third ventricle (RP3V).* *Brain Research Review, Brain res rev* 2008;57:277-287.
- HOSNY S, JENNES L. *Identification of alpha 1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurons of the female rat.* *J. Neuroendocrinol.* 1998; 10:687-692.
- HOTCHKISS AK, LAMBRIGHT CS, OSTBY JS, PARKS-SALDUTTI L, VANDENBERGH JG, GRAY LEJ. *Prenatal testosterone exposure permanently masculinizes anogenital distance, nipple development, and reproductive tract morphology in female Sprague-Dawley rats.* *Toxicol Sci* 2007;96:335–345.
- JENNES L, JENNES ME, PURVIS C AND NEES M. *c-fos expression in noradrenergic A2 neurons of the rat during the estrous cycle and after steroid hormone treatments.* *Brain Research.* 1992;586:171-175.
- KALIL B, RIBEIRO AB, LEITE CM, UCHÔA ET, CAROLINO RO, CARDOSO TSR, ELIAS LLK, RODRIGUES JA, PLANT TM, POLETINI MO, ANSELMO-FRANCI JA. *The Increase in Signaling by Kisspeptin Neurons in the Preoptic Area and Associated Changes in Clock Gene Expression That Trigger the LH Surge in Female Rats Are Dependent on the Facilitatory Action of a Noradrenaline Input.* *Endocrinol* 2016;157:323–335.
- LEITE CM, KALIL B, UCHÔA ET, ANTUNES-RODRIGUES J, ELIAS LKL, LEVINE JE, ANSELMO-FRANCI JA. *Progesterone-induced amplification and advancement of*

- GnRH/LH surges are associated with changes in kisspeptin system in preoptic area of estradiol-primed female rats.* Brain Research, v. 1650, p. 21-30. 2016
- LIE MEK, OVERGAARD A, MIKKELSEN JD. *Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats.* Reproductive Biology 2013;13: 298–308.
- LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Ct method.* Methods 2001;25:402–408.
- MARQUES SE. *Influência da redução de ninhada sobre o comportamento materno e respostas comportamentais e endócrinas da prole na fase adulta.* Dissertação (Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas) da Universidade Federal de Alfenas - MG. 2014
- MIRA-ESCOLANO MP, MENDIOLA J, MINGUEZ-ALARCON L, MELGAREJO M, CUTILLAS-TOLIN A, ROCA M, LOPEZ-ESPIN JJ, NOGUERA-VELASCO JÁ, TORRES-CANTERO AM. *Longer anogenital distance is associated with higher testosterone levels in women: a cross-sectional study.* BJOG 2014;121:1359–1364.
- MUST A, JACQUES PF, DALLAL GE, BAJEMA CJ,.; DIETZ WH. *Longterm morbidity and mortality of overweight adolescents: a follow-up of the Harvard Growth Study 1922 to 1935.* The New England Journal of Medicine, v. 327, p. 1350-1355, 1992.
- NASCIMENTO AF, SUGIZAKI MM, LEOPOLDO AS, LIMA-LEOPOLDO AP, LUVIZOTTO RA, NOGUEIRA CR. *A hypercaloric pellet-diet cycle induces obesity and co-morbidities in Wistar rats.* Arq Bras Endocrinol Metabol. 2008;52:968-74.
- NAVARRO VM, CASTELLANO JM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, TOVAR S, ROA J, MAYEN A, BARREIRO ML. *Effects of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54, on Follicle-Stimulating Hormone Secretion in the Rat.* Endocrinol 2005a;146:1689-1697.
- NAVARRO VM, CASTELLANO JM, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ R, TENA-SEMPERE M. *Characterization of the Potent Luteinizing Hormone-Releasing Activity of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54.* Endocrinol 2005b;146:156-163.
- NELSON SM, FLEMING R. *Obesity and reproduction: impact and interventions.* Curr Opin Gynecol Obstet 2007;19:384-389.
- NOSADINI R, DEL PRATO S, TIENGO A, VALERIO A, MUGGEO M, OPOCHER G, MANTERO F, DUNER F, MARESCOTTI C, MOLLO F, BELLONI F. *Insulin resistance in Cushing's syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 1983;57:529-536.
- OAKLEY AE, CLIFTON DK, A. STEINER RA. *Kisspeptin Signaling in the Brain.* Endocrine Rev 2009;30:713-743
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS), disponível em [<http://www.abeso.org.br/atitude-saudavel/mapa-obesidade>]. Acesso em: 20 de agosto de 2019.
- OSTBY JS, GRAY LEJ. *Transgenerational (in utero/lactational) exposure to investigate the effects of endocrine disrupting compounds (EDCS) in rats.* Curr Protoc Toxicol 2004;Ch 16:unit 16.8.
- PASQUALI R, PATTON L, GAMBINERI A. *Obesity and infertility.* Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity, v. 14, p. 482-487, 2007.
- PANKEVICH DE, MUELLER BR, BROCKEL BB ALE T.L. *Prenatal stress programming of offspring feeding behavior and energy balance begins early in pregnancy.* Physiological Behavior, 2009;98:94–102.

- PATTERSON CM, DUNN-MEYNELL AA, LEVIN BE. *Three weeks of early-onset exercise prolongs obesity resistance in DIO rats after exercise cessation.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008;294:290–301
- PINEDA R, GARCIA-GALIANO D, ROSEWEIR A, ROMERO M, SANCHEZ-GARRIDO MA, RUIZ-PINO F, MORGAN K, PINILLA L, MILLAR RP, TENA-SEMPERE M. *Critical Roles of Kisspeptins in Female Puberty and Preovulatory Gonadotropin Surges as Revealed by a Novel Antagonist.* Endocrinol 2010;1:722-730.
- RAMEZANI TEHRANI F, NOROOZZADEH M, ZAHEDIASL S, PIRYAEI A, HASHEMI S, AZIZI F. *The time of prenatal androgen exposure affects development of polycystic ovary syndrome-like phenotype in adulthood in female rats.* Int J Endocrinol Metab 2014;12:e16502.
- RINALDI W, RIBEIRO TAS; MARQUES AS. Effect of small litter size on the autonomic and metabolic responses of Wistar rats. Rev Nutr 2012;25.
- ROBKER RL. Evidence that obesity alters the quality of oocytes and embryos. J Pathophys 2008;15:115-121.
- ROBKER RL, AKISON LK, BENNETT BD. Obese women exhibit differences in ovarian metabolites, hormones, and gene expression compared with moderate-weight women. J Clin Endocrinol & Metab 2009;94:1533-1540.
- ROBERTSON JL. CLIFTON DK. DE LA IGLESIA HO; STEINER RA, KAUFFMAN AS. *Circadian regulation of Kiss1 neurons: implications for timing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone/luteinizing hormone surge.* Endocrinology, v. 150(8), p. 3664 –3671. 2009.
- RODRIGUES AL, DE MOURA EG, PASSOS MC, DUTRA SC, LISBOA PC. *Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats.* J Physiol 2009;587:2647–2661.
- RODRIGUES AL, de SOUZA EP da SILVA, RODRIGUES DO NASCIMENTO A.B. BARJA-FIDALGO, C. *Low expression of insulin signaling molecules impairs glucose uptake in adipocytes after early overnutrition.* Journal of Endocrinology, v.195, p. 485–494, 2007.
- SÁNCHEZ-GARRIDO MA, RUIZ-PINO F, MANFREDI-LOZANO M, LEON S, HERAS V, ROMERO-RUIZ A, PINILLA L, TENA-SEMPERE M. *Metabolic and Gonadotropic Impact of Sequential Obesogenic Insults in the Female: Influence of the Loss of Ovarian Secretion.* J Endocrinol 2015;156:2984 –2998.
- SARAIVA MVA, MATOS MHT, FAUSTINO LR, CELESTINO JH, Šefčiková Z, Bujnakova D, Racek L, Kmet V, Mozes S. *Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests.* Physiol Res 2011;60:337–646.
- SCHWARTZ CL, CHRISTIANSEN S, VINGGAARD AM, AXELSTAD M, SVINGEN UH. *Anogenital distance as a toxicological or clinical marker for fetal androgen action and risk for reproductive disorders,* 2019;93:253–272.
- ŠEFČIKOVÁ Z, BUJNAKOVA D, RACEK L, KMET V, MOZES S. *Developmental changes in gut microbiota and enzyme activity predict obesity risk in rats arising from reduced nests.* Physiol Res. 2011;60:337–646
- SILVA JR V, FIGUEIREDO JR. Revista Brasileira de Reprodução Animal, 2010;34:206-221.

- SHANKAR K, HARRELL A, LIU X, GILCHRIST JM, RONIS MJ, BADGER TM. *Maternal obesity at conception programs obesity in the offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2008;294:28–38.
- SKINNER DC, CARATY A, ALLINGHAM R. *Unmasking the progesterone receptor in the preoptic area and hypothalamus of the ewe: no co-localization with gonadotropin-releasing neurons*. Endocrinology, v. 142(2), p. 573–579. 2001.
- SMITH JT, DUNGAN HM, STOLL EA, GOTTSCH ML, BRAUN RE, STEINER RA. *Differential regulation of KISS-1 mRNA expression by sex steroids in the brain of the male mouse*. Endocrinology, 2005;146: 2976-2984.
- SMITH JT. *The role of kisspeptin and gonadotropin inhibitory hormone in the seasonal regulation of reproduction in sheep*. Domestic Animal Endocrinology, . 2012;43: 75–84.
- SPENCER SJ. *Perinatal programming of neuroendocrine mechanisms connecting feeding behavior and stress*. Frontiers in Neuroscience., v.7, 2013.
- STEFANIDIS A, SPENCER SJ. *Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat*. PLoS One, v.7, p.52130, 2012.
- SULLIVAN EL, SMITH MS, GROVE KL. *Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood*. Neuroendocrinology, 2011;93:1-8.
- TORTORIELLO DV, MCMINN J, CHUA SC. *Dietary-induced obesity and hypothalamic infertility in female DBA/2J mice*. J Endocrinol 2004;145:1238-1247.
- VELKOSKA E, COLE TJ, MORRIS MJ. *Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers*. American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism, v. 288, p. 1236–1243, 2005.
- VENANCIO JC, MARGATHO LO, RORATO R, ROSALES DEBARBA, LK COLETTI R; ANTUNES-RODRIGUES J, ELIAS CF, ELIAS LLK. *Short-Term High Fat Diet Increases Leptin Activation of CART Neurons and Advances Puberty in Female Mice*. Endocrinology, 2017;158:3929-3942.
- VIGITEL. *Vigilância De Fatores De Risco E Proteção Para Doenças Crônicas Por Inquérito Telefônico*. 2016
- WANG H, JI J, YU Y, WEI X, CHAI S, LIU D, HUANG D, DONG Z, XIAO X. *Neonatal Overfeeding in Female Mice Predisposes the Development of Obesity in their Male Offspring via Altered Central Leptin Signaling*. J Neuroendocrinol 2015;27:600-608.
- WILLIAMS WP, JARJISIAN SG, MIKKELSEN JD, KRIEGSFELD LJ. *Circadian control of kisspeptin and a gated GnRH response mediate the preovulatory luteinizing hormone surge*. Endocrinology, 2011;152: 595– 606.
- WU XQ, LI XF, XIA WT, YE B, O'BYRNE KT. *The effects of small litter rearing on ovarian function at puberty and adulthood in the rat* 2016;16:130-137.
- WU XQ, LI XF, XIA WT, YE B, O'BYRNE KT. *The effects of small litter rearing on ovarian function at puberty and adulthood in the rat* 2016;16:130-137.
- WU Y, ZHONG G, CHEN S, ZHENG C, LIAO D, XIE M. *Polycystic ovary syndrome is associated with anogenital distance, a marker of prenatal androgen exposure*. Hum reprod 2017;32:937–943.
- ZHOU Q, CHEN H, YANG S, LI Y, WANG B, CHEN Y WU X. *High-fat diet decreases the expression of Kiss1 mRNA and kisspeptin in the ovary, and increases ovulatory dysfunction in postpubertal female rats*. Reproductive Biology and Endocrinology. 2014;12:127.

ANEXO

Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEL



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 60/2019

Londrina, 24 de abril de 2019.

Prezado (a) professor (a)

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: “Supernutrição pós-natal por redução da ninhada: efeitos nos parâmetros metabólicos e reprodutivos em fêmeas e participação dos glicocorticoides nas alterações metabólicas em machos” protocolo CEUA nº 3457.2019.11 sob a responsabilidade de **Ernane Torres Uchôa**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UDEL), em **24/04/2019**.

Este projeto tem por objetivo avaliar os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada no desenvolvimento sexual, metabólico e comportamento reprodutivo de fêmeas e de suas proles, e avaliar os efeitos da adrenalectomia e do tratamento prolongado com corticosterona nas respostas induzidas pelo método de manipulação do tamanho da ninhada na homeostase energética em machos. Grau de Invasividade: 3

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/06/2019 a 31/05/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	Matrizes: 80 machos e 60 fêmeas oriundos do Biotério Central do CCB Prole estimada - 1ª geração: 300 machos e 300 fêmeas Prole estimada - 2ª geração: 100 machos e 100 fêmeas Total: 940 animais
Peso/ Idade	Matrizes adultas: 210-230g Prole estimada - 1ª geração: 60 a 90 dias Prole estimada - 2ª geração: 60 dias
Sexo	480 Machos e 460 fêmeas
Origem	Biotério Central do CCB da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, cérebro, tecido adiposo, swab vaginal e adrenais

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UDEL anteriormente à execução das modificações.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente.

Maria Fernanda R. Graciano
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da CEUA/UDEL

Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
 Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Universidade Estadual de Londrina
 ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)
Prof. (a) Dr. (a). Ernane Torres Uchôa
Responsável pelo projeto
 Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB
 C/C para a Chefia do Depto. de Ciências Fisiológicas/CCB
 C/C para a Direção de Centro do CCB
 C/C para o Biotério Central/CCB