



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LARISSA RUGILA DOS SANTOS STOPA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM VITAMINA C NA VIDA  
ADULTA NA HOMEOSTASE ENERGÉTICA DE RATOS COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR SUPERNUTRIÇÃO POR  
REDUÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

LARISSA RUGILA DOS SANTOS STOPA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM VITAMINA C NA VIDA  
ADULTA NA HOMEOSTASE ENERGÉTICA DE RATOS COM  
OBESIDADE INDUZIDA POR SUPERNUTRIÇÃO POR  
REDUÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas na Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Glaura  
Scantamburlo Alves Fernandes

Londrina  
2024

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

S883e Stopa, Larissa Rugila dos Santos .

Efeitos do tratamento com vitamina C na vida adulta na homeostase energética de ratos com obesidade induzida por supernutrição por redução do tamanho da ninhada / Larissa Rugila dos Santos Stopa. - Londrina, 2024.  
90 f. : il.

Orientador: Ernane Torres Uchôa.

Coorientador: Glaura Scantamburlo Alves Fernandes.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Ácido ascórbico - Tese. 2. Obesidade infantil - Tese. 3. Fígado - Tese. 4. Músculo esquelético - Tese. I. Torres Uchôa, Ernane . II. Scantamburlo Alves Fernandes, Glaura. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. IV. Título.

CDU 612

LARISSA RUGILA DOS SANTOS STOPA

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM VITAMINA C NA VIDA ADULTA  
NA HOMEOSTASE ENERGÉTICA DE RATOS COM OBESIDADE  
INDUZIDA POR SUPERNUTRIÇÃO POR REDUÇÃO DO TAMANHO  
DA NINHADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas na Universidade Estadual de Londrina, como requisito para obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Prof. Dr. Lucas Kniess Debarba  
Weill Cornell Medicine

---

Prof. Dr. Rafael Deminice  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Priscila Cassolla  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Graziela Scaliante Ceravolo  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 22 de março de 2024.



Dedico este trabalho ao meu esposo, Willian, à minha mãe, Sandra, e ao meu tio e padrinho Nerivan, que se foi tão cedo deste mundo, mas sempre torceu muito por mim e certamente comemoraria com muita alegria esse título. Sua falta será sempre sentida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela saúde e todas as bênçãos que me trouxeram até aqui, e também por todas as pessoas incríveis com quem convivi na UEL nesses 10 anos. Agradeço ao meu orientador, Prof Dr Ernane, que me recebeu no laboratório em 2015, e confiou a mim, uma IC de 18 anos e completamente inexperiente, um projeto complexo que me conquistou para a pesquisa. Eu serei sempre grata por todos os ensinamentos e pela orientação equilibrada entre ser firme e paciente. Agradeço também por ao longo desses anos ter se tornado um amigo, ouvindo e aconselhando com carinho e paciência. Agradeço à professora Cristiane Leite, que além de toda a contribuição científica, também se tornou uma amiga. À minha co-orientadora, professora Glaura Fernandes, e à professora Thaís Zaia, pelo suporte científico, disponibilidade, colaboração e carinho. Ao professor Fábio Goulart e ao professor Waldiceu Verri, que abriram as portas de seus laboratórios para colaborar conosco.

Muitos colegas fizeram parte do grupo de pesquisa ao longo desses anos, e eu sou grata por ter convivido e trabalhado com cada um deles. Agradeço, de maneira especial, à Ana Luiza Wunderlich, Andressa Busetti, Camila Souza, Gabriela Mendicelli e Marcela Garnica, antigas colegas de laboratório e grandes amigas da vida. E também ao grupo atual: Danielly Duarte, Júlia Bandeira, Polyana Shishido. Além da parceria no trabalho, se tornaram grandes amigas. À Rhauany Pelisson, que é do atual grupo do laboratório, e também é uma das minhas melhores amigas. Ela tornou meu doutorado muito mais fácil e divertido, além de ser um apoio emocional para todo momento. Agradeço a todos os alunos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho: Fabiano Tsutsui, Karina Sobota, Kawane Moura, Nicole Miya e Pedro Rocha. Agradeço também o suporte dos técnicos Afonso Saiz, Fujiko Morinaga e Wagner Risso.

Mas sem o apoio da minha família, nada disso seria possível. Agradeço ao meu esposo, Willian, que me apoiou a cada dia e noite de estudo, desde o vestibular, graduação, mestrado e doutorado. Ele me faz acreditar que sou capaz de realizar qualquer sonho. Ele sempre foi meu ponto de paz e um catalisador da minha evolução. Essa conquista é nossa, por nós e nossa família. Agradeço também aos meus filhos felinos, Axl e Abel, as maiores fontes de serotonina da minha vida. Gratidão aos meus pais, Alexandre e Sandra, que nunca deixaram de torcer e rezar por mim. À minha mãe sou especialmente grata por toda a dedicação e sacrifício. À minha irmã, Ana Luiza, que é minha vida. Aos meus avós, José e Sueli, com quem sempre posso contar. Aos meus falecidos avós, Dorinha e Sérgio, que hoje certamente estariam comemorando comigo. Aos meus tios Cristiane, Gustavo e Nerivan (*in memoriam*), que sempre torcem por mim. Aos meus primos Isadora, Ingrid e Gregório, que deixam a caminhada mais leve. À minha segunda família, Neusa, Nelson e Leonardo. Nem todas as palavras do mundo seriam suficientes para expressar o meu sentimento de amor e gratidão por toda minha família. Não poderia deixar de agradecer também às minhas amigas, que sempre me ouvem, apoiam e são um alívio (cômico) no meu dia-a-dia: Brunna Luiza, Bruna Corchelli, Gabriella Marigo, Jéssica Hisnauer e Karoline Buss. E às minhas afilhadas Helena Castro e Mercedes Lipinski, que trazem cor à minha vida.

Finalmente, agradeço ao Programa de Ciências Fisiológicas, à coordenadora, professora Graziela Ceravolo e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq pelo apoio financeiro, que tornou possível a realização deste projeto e a dedicação ao Doutorado.

STOPA, Larissa Rugila dos Santos. **Efeitos do tratamento com vitamina C na vida adulta na homeostase energética de ratos com obesidade induzida por supernutrição por redução do tamanho da ninhada.** 2024. 90 f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

### **Resumo**

Os primeiros anos de vida são críticos para o desenvolvimento, já que este é um período de plasticidade neuroendócrina e o organismo está suscetível à programação metabólica. A obesidade está associada ao estresse oxidativo (EO) e inflamação crônica de baixo grau. Há evidências de que a suplementação com compostos antioxidantes pode mitigar esses efeitos danosos. O objetivo deste trabalho foi avaliar em ratos Wistar com obesidade induzida por supernutrição lactacional, quais (e se) os parâmetros metabólicos e o balanço redox foram afetados pelo tratamento por 30 dias com vitamina C (VitC) na vida adulta. No Estudo 1, os animais foram avaliados até o dia pós-natal (DPN) 60 para compreender o perfil metabólico, inflamatório e estado redox pré-tratamento (Ninhada normal, NL e Ninhada reduzida, SL). No Estudo 2, os animais foram tratados por via oral (gavagem) com Vitamina C (VitC) - 100 mg/dia de rato - ou veículo (v: água corrente), do DPN 60 ao 89, formando os grupos NLv, SLv, SLvitC, que foram avaliados até o DPN 90. No DPN 60, o grupo SL apresentou maior peso corporal e adiposidade, com hipertrofia adipocitária, mesmo com redução da ingestão alimentar, e intolerância à glicose. O fígado apresentou dano oxidativo e aumento de citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$ . O músculo sóleo (MS) também apresentou peroxidação lipídica, e no músculo gastrocnêmio (MG) houve aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO). Nos hepatócitos e miócitos, houve maior deposição lipídica, enquanto a concentração plasmática de triacilgliceróis foi diminuída. No DPN 90, o grupo SLv manteve a maior adiposidade, e apresentou redução de massa muscular esquelética, além de glicemia basal aumentada, resistência à insulina e intolerância à glicose. No fígado, a atividade antioxidante foi reduzida no grupo SLv (desequilíbrio redox), e no MG houve aumento de ERO e no MS dano oxidativo (peroxidação lipídica). Nos hepatócitos e miócitos (MG) houve redução da concentração de glicose e lipídios, e nos miócitos do MS houve menor concentração de glicose nos animais SLv. No DPN 90, o tratamento com Vitamina C, foi capaz de reduzir ganho de peso corporal, tamanho dos adipócitos, concentração de lipídios plasmáticos, resistência à insulina e intolerância à glicose em animais com obesidade induzida por supernutrição lactacional. No fígado e MS, observou-se redução da peroxidação lipídica, e no MG e MS, observou-se aumento da concentração de lipídios no grupo SLvitC. Assim, o tratamento com vitamina C por 30 dias na idade adulta foi capaz de mitigar, e em alguns parâmetros reverter, os desequilíbrios metabólicos e oxidativos nos principais tecidos metabólicos induzidos pela supernutrição da lactação, indicando que o EO provavelmente contribui para as alterações metabólicas observadas em ratos machos adultos com obesidade por programação neonatal.

**Palavras-chave:** Supernutrição lactacional. Ácido ascórbico. Antioxidante. Músculo esquelético. Fígado.

## Abstract

STOPA, Larissa Rugila dos Santos. **Effects of vitamin C treatment in adulthood on energy homeostasis in rats with obesity induced by overnutrition due to litter size reduction.** 2024. 90 pp. Thesis (Doctorate's degree in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2024.

The first years of life are critical for development, as this is a neuroendocrine plasticity period and the organism is susceptible to metabolic programming. Obesity is associated with oxidative stress (OS) and chronic low-grade inflammation. There is evidence that supplementation with antioxidant compounds can mitigate these harmful effects. The aim of this work was to evaluate in male Wistar rats with obesity induced by lactational overnutrition, which (and if) metabolic parameters and redox balance were affected by the treatment for 30 days with vitamin C (VitC) in adult life. In Study 1, animals were evaluated until postnatal day (PND) 60 to investigate the pre-treatment metabolic, inflammatory profile and redox status (normal litter, NL and small litter, SL). In Study 2, animals were orally (gavage) treated with Vitamin C (VitC) - 100 mg/day of rat - or vehicle (tap water), from postnatal day (PND) 60 to 89, forming NLv, SLv, SLvitC groups, which were evaluated until PND 90. On PND 60, the SL group presented increased body weight and adiposity, with adipocyte hypertrophy, even with reduced food intake, and glucose intolerance. This group also showed oxidative damage and an increase in the pro-inflammatory cytokine IL-1 $\beta$  in the liver. SL animals also presented lipid peroxidation in the soleus muscle (MS) and an increase in reactive oxygen species (ROS) in the gastrocnemius muscle (MG). In hepatocytes and myocytes, there was an increase in lipid deposition, while the plasma triacylglycerols levels were reduced in SL animals. On PND 90, the SLv group maintained the increased adiposity, and showed reduced skeletal muscle mass, in addition to increased basal blood glucose, insulin resistance and glucose intolerance. In the liver, antioxidant activity was reduced (redox imbalance), and there was an increase in ROS in the MG and oxidative damage in the MS (lipid peroxidation) of SLv group. In hepatocytes and myocytes (MG), there were reductions in glucose and lipid levels, and there was a lower glucose level in MS myocytes of SLv animals. On PND 90, treatment with Vitamin C was able to reduce body weight gain, adipocyte size, plasma lipids, insulin resistance and glucose intolerance in animals with obesity induced by lactational overnutrition. In the liver and MS, there was a reduction in lipid peroxidation, and an increase in lipid level in the MG and MS of SLvitC group. Thus, treatment with vitC for 30 days in adulthood was able to mitigate, and in some parameters even to reverse, the metabolic and oxidative imbalances in the main metabolic tissues induced by lactation overnutrition, indicating that OS probably contributes to the metabolic changes observed in adult male rats with obesity induced by neonatal programming.

**Key-words:** Lactational overnutrition. Ascorbic acid. Antioxidant. Skeletal muscle. Liver.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Linha do tempo do Estudo 1: resumo da metodologia.....                                                 | 28 |
| <b>Figura 2.</b> Linha do tempo do Estudo 2: resumo da metodologia.....                                                 | 29 |
| <b>Figura 3.</b> Perfil morfométrico dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                                  | 39 |
| <b>Figura 4.</b> Perfil lipídico dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                                      | 41 |
| <b>Figura 5.</b> Perfil glicêmico dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                                     | 42 |
| <b>Figura 6.</b> Perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60.....                               | 43 |
| <b>Figura 7.</b> Perfil oxidativo no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                           | 44 |
| <b>Figura 8.</b> Perfil inflamatório no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                        | 46 |
| <b>Figura 9.</b> Perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60.....                 | 47 |
| <b>Figura 10.</b> Perfil oxidativo no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60....                             | 48 |
| <b>Figura 11.</b> Perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60.....                       | 50 |
| <b>Figura 12.</b> Perfil oxidativo no músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                   | 51 |
| <b>Figura 13.</b> Perfil morfométrico dos grupos NLv, SLv, e SLvitC no DPN 90.....                                      | 53 |
| <b>Figura 14.</b> Perfil lipídico dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....                                      | 56 |
| <b>Figura 15.</b> Perfil glicêmico dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....                                     | 57 |
| <b>Figura 16.</b> Perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....               | 58 |
| <b>Figura 17.</b> Perfil oxidativo no fígado dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....                           | 59 |
| <b>Figura 18.</b> Perfil inflamatório no fígado dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....                        | 61 |
| <b>Figura 19.</b> Perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90..... | 62 |
| <b>Figura 20.</b> Perfil oxidativo no músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....             | 63 |
| <b>Figura 21.</b> Perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....        | 65 |
| <b>Figura 22.</b> Perfil oxidativo no músculo sóleo dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90.....                    | 66 |
| <b>Figura 23.</b> Resumo dos resultados estatisticamente significativos do Estudo 1 (NL e SL no DPN 60).....            | 68 |

|                                                                                                                   |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 24.</b> Resumo dos resultados estatisticamente significativos do Estudo 2 (NLv e SLv no DPN 90).....    | 73 |
| <b>Figura 25.</b> Resumo dos resultados estatisticamente significativos do Estudo 2 (SLv e SLvitC no DPN 90)..... | 77 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 1.</b> Descrição estatística do perfil morfométrico dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                  | 40 |
| <b>Tabela 2.</b> Descrição estatística do perfil lipídico dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                      | 41 |
| <b>Tabela 3.</b> Descrição estatística do GTT dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                                  | 42 |
| <b>Tabela 4.</b> Descrição estatística do perfil glicêmico dos grupos NL e SL no DPN 60.....                                     | 42 |
| <b>Tabela 5.</b> Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60.....               | 43 |
| <b>Tabela 6.</b> Descrição estatística do perfil oxidativo do fígado dos grupos NL e SL no DPN 60.....                           | 45 |
| <b>Tabela 7.</b> Descrição estatística do perfil inflamatório no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60.....                        | 46 |
| <b>Tabela 8.</b> Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60..... | 47 |
| <b>Tabela 9.</b> Descrição estatística do perfil oxidativo no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60.....             | 49 |
| <b>Tabela 10.</b> Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60.....       | 50 |
| <b>Tabela 11.</b> Descrição estatística do perfil oxidativo do músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60.....                   | 51 |
| <b>Tabela 12.</b> Descrição estatística do perfil morfométrico dos grupos NLv, SLv, e SLvitC no DPN 90.....                      | 55 |
| <b>Tabela 13.</b> Descrição estatística do perfil lipídico dos grupos NLv, SLv, e SLvitC no DPN 90.....                          | 56 |
| <b>Tabela 14.</b> Descrição estatística do GTT dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....                                       | 57 |
| <b>Tabela 15.</b> Descrição estatística do perfil glicêmico dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....                          | 57 |
| <b>Tabela 16.</b> Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....    | 58 |
| <b>Tabela 17.</b> Descrição estatística do perfil oxidativo do fígado dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....                | 60 |
| <b>Tabela 18.</b> Descrição estatística do perfil inflamatório do fígado dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....             | 61 |

|                                                                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 19.</b> Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90..... | 62 |
| <b>Tabela 20.</b> Descrição estatística do perfil oxidativo do músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....             | 64 |
| <b>Tabela 21.</b> Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....        | 65 |
| <b>Tabela 22.</b> Descrição estatística do perfil oxidativo do músculo sóleo dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90.....                    | 67 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP: Adenosina trifosfato  
AUC do GTT: Área sob a curva do teste de tolerância à glicose  
CAT: Catalase  
DPN: Dia pós natal  
ERO: Espécies reativas de oxigênio  
EO: Estresse oxidativo  
FRAP: Poder antioxidante redutor férrico  
GLUT2: Transportador de Glicose 2  
GLUT4: Transportador de Glicose 4  
GSH: Glutathione reduzida  
GSH-Px: Glutathione-peroxidase  
GSH-Rd: Glutathione-redutase  
GST: Glutathione-s-transferase  
GTT: Teste de tolerância à glicose  
HDL: High Density Lipoprotein (Lipoproteína de alta densidade)  
HFD: High Fat Diet (dieta hiperlipídica)  
HSL: Enzima lipase hormônio-sensível  
IL-1 $\beta$ : Interleucina-1 $\beta$   
IL-6: Interleucina-6  
LDL: Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de baixa densidade)  
MDA: Malondialdeído  
MG: Músculo gastrocnêmio  
MS: Músculo sóleo  
NBT: Tetrazólio nitroazul  
NL: Ninhada normal  
PPAR: Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos  
PL: Peroxidação lipídica  
RNAm: RNA mensageiro  
SL: Small litter (ninhada reduzida)  
SOD: Superóxido-dismutase  
TAE: Tecido adiposo epididimal  
TAR: Tecido adiposo retroperitoneal  
TAB: Tecido adiposo branco

TAM: Tecido adiposo marrom

TB: Tecido adiposo bege

TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

TNF $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

TyG: Triacilgliceróis/glicose

UCP-1: Proteína desacopladora-1

VitC: Vitamina C

VLDL: Very Low Density Lipoprotein (Lipoproteína de muita baixa densidade)

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                        |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO:</b>                                                                                                                                                                  | <b>15</b> |
| 1.1 Obesidade Infantil e Mimetização em Modelo Animal                                                                                                                                  | 15        |
| 1.2 Fígado na Homeostase Energética                                                                                                                                                    | 16        |
| 1.3 Musculatura Esquelética na Homeostase Energética                                                                                                                                   | 17        |
| 1.4 Tecido Adiposo na Homeostase Energética                                                                                                                                            | 18        |
| 1.5 Acúmulo de Tecido Adiposo                                                                                                                                                          | 19        |
| 1.6 Obesidade e Estresse Oxidativo                                                                                                                                                     | 21        |
| 1.7 Antioxidantes                                                                                                                                                                      | 23        |
| <b>2. JUSTIFICATIVA</b>                                                                                                                                                                | <b>25</b> |
| <b>3. OBJETIVOS</b>                                                                                                                                                                    | <b>25</b> |
| <b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b>                                                                                                                                                          | <b>26</b> |
| 4.1 Animais                                                                                                                                                                            | 26        |
| 4.2 Drogas                                                                                                                                                                             | 27        |
| 4.3 Protocolos Experimentais                                                                                                                                                           | 27        |
| 4.3.1 Estudo 1: Avaliação de animais com obesidade induzida por supernutrição neonatal por redução do tamanho da ninhada no DPN 60                                                     | 27        |
| 4.3.2 Estudo 2: Avaliação dos efeitos do tratamento com vitC na vida adulta (DPN 60-89) de animais com obesidade induzida por supernutrição neonatal por redução do tamanho da ninhada | 28        |
| 4.4 Perfil Morfológico                                                                                                                                                                 | 29        |
| 4.4.1 Aferição do peso corporal                                                                                                                                                        | 29        |
| 4.4.2 Cálculo da ingestão alimentar                                                                                                                                                    | 29        |
| 4.4.3 Cálculo do índice de Lee                                                                                                                                                         | 30        |
| 4.4.4 Análise histológica de adipócitos do TAE e TAR                                                                                                                                   | 30        |
| 4.4.5 Peso de TAE, TAR, MG e MS                                                                                                                                                        | 30        |
| 4.4.6 Dosagem plasmática de ácido úrico                                                                                                                                                | 30        |
| 4.5 Perfil Lipídico                                                                                                                                                                    | 31        |
| 4.5.1 Colesterol total                                                                                                                                                                 | 31        |
| 4.5.2 Colesterol HDL                                                                                                                                                                   | 31        |
| 4.5.3 Colesterol LDL                                                                                                                                                                   | 31        |
| 4.5.4 Triacilgliceróis                                                                                                                                                                 | 31        |
| 4.6 Perfil glicêmico                                                                                                                                                                   | 32        |
| 4.6.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)                                                                                                                                              | 32        |
| 4.6.2 Glicose plasmática                                                                                                                                                               | 32        |
| 4.6.3 Índice de TyG                                                                                                                                                                    | 32        |
| 4.7 Análise Fontes Energéticas do Fígado, Músculo Gastrocnêmio e Músculo Sóleo                                                                                                         | 33        |
| 4.7.1 Concentração de glicose                                                                                                                                                          | 33        |
| 4.7.2 Concentração de glicogênio                                                                                                                                                       | 33        |
| 4.7.3 Concentração de colesterol e triacilgliceróis                                                                                                                                    | 34        |
| 4.8 Perfil Oxidativo                                                                                                                                                                   | 34        |
| 4.8.1 Ensaio de TBARS                                                                                                                                                                  | 34        |

|                                                          |           |
|----------------------------------------------------------|-----------|
| 4.8.2 Redução de NBT.....                                | 35        |
| 4.8.3 GST.....                                           | 35        |
| 4.8.4 GSH.....                                           | 35        |
| 4.8.5 Atividade da catalase.....                         | 35        |
| 4.8.6 Atividade da superóxido dismutase.....             | 36        |
| 4.8.7 FRAP.....                                          | 36        |
| 4.8.8 ABTS.....                                          | 36        |
| 4.9 Citocinas Inflamatórias.....                         | 37        |
| 4.10 Análises Estatísticas.....                          | 37        |
| <b>5. RESULTADOS.....</b>                                | <b>38</b> |
| 5.1 Estudo 1.....                                        | 38        |
| 5.1.1 Perfil morfofisiológico.....                       | 38        |
| 5.1.2 Perfil lipídico.....                               | 41        |
| 5.1.3 Perfil glicêmico.....                              | 41        |
| 5.1.4 Fígado: fontes energéticas.....                    | 43        |
| 5.1.5 Fígado: perfil oxidativo.....                      | 43        |
| 5.1.6 Fígado: citocinas inflamatórias.....               | 45        |
| 5.1.7 Músculo gastrocnêmio: fontes energéticas.....      | 46        |
| 5.1.8 Músculo gastrocnêmio: perfil oxidativo.....        | 47        |
| 5.1.9 Músculo gastrocnêmio: citocinas inflamatórias..... | 49        |
| 5.1.10 Músculo sóleo: fontes energéticas.....            | 49        |
| 5.1.11 Músculo sóleo: perfil oxidativo.....              | 50        |
| 5.1.12 Músculo sóleo: citocinas inflamatórias.....       | 52        |
| 5.2 Estudo 2.....                                        | 52        |
| 5.2.1 Perfil morfofisiológico.....                       | 52        |
| 5.2.2 Perfil lipídico.....                               | 55        |
| 5.2.3 Perfil glicêmico.....                              | 56        |
| 5.2.4 Fígado: fontes energéticas.....                    | 58        |
| 5.2.5 Fígado: perfil oxidativo.....                      | 59        |
| 5.2.6 Fígado: citocinas pró-inflamatórias.....           | 60        |
| 5.2.7 Músculo gastrocnêmio: fontes energéticas.....      | 61        |
| 5.2.8 Músculo gastrocnêmio: perfil oxidativo.....        | 62        |
| 5.2.9 Músculo gastrocnêmio: citocinas inflamatórias..... | 64        |
| 5.2.10 Músculo sóleo: fontes energéticas.....            | 64        |
| 5.2.11 Músculo sóleo: perfil oxidativo.....              | 65        |
| 5.2.12 Músculo sóleo: citocinas inflamatórias.....       | 67        |
| <b>6. DISCUSSÃO.....</b>                                 | <b>66</b> |
| <b>7. CONCLUSÕES.....</b>                                | <b>79</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                  | <b>80</b> |
| <b>ANEXO.....</b>                                        | <b>90</b> |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Obesidade Infantil e Mimetização em Modelo Animal

Nas últimas quatro décadas, a prevalência do excesso de peso infantil tem aumentado de maneira epidêmica, e é um grande problema de saúde pública no mundo. O excesso de peso compreende tanto sobrepeso quanto a obesidade, e estima-se que, no Brasil, considerando todas as crianças menores de 10 anos, cerca de 9 milhões encontram-se nessa condição (Ministério da Saúde, 2022). A obesidade está associada a fatores de risco cardiovascular, dislipidemias, resistência à insulina, diabetes mellitus tipo 2, doenças hepáticas, entre outros prejuízos à saúde física (Li et al., 2015).

A teoria Desenvolvimentista da Saúde e Doença, conhecida como DOHaD, propõe que doenças não transmissíveis, como doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2, podem ter suas origens durante o período perinatal e nos primeiros dias de vida. Esse fenômeno é chamado de programação metabólica. Os estágios de gestação e lactação são especialmente sensíveis, já que este é um período de plasticidade neuroendócrina e o organismo está suscetível à programação metabólica (Barker, 1998).

O excesso de peso na infância está relacionado com o aumento do risco de tornar-se um adulto com obesidade (Kumar et al., 2017; Lakshman et al., 2012; Epstein et al., 1985). Crianças com obesidade possuem 75% mais chances de se tornarem adolescentes com obesidade, e dessa porcentagem de adolescentes, 89% podem se tornar adultos com essa doença (Kartiosuo et al., 2019). Deste modo, as comorbidades desta condição podem permanecer a curto, médio e longo prazo, o que acarreta um grande prejuízo à saúde pública.

Tendo isso em vista, na última década, tem sido bastante utilizada uma metodologia de indução de obesidade em modelo animal, buscando a possibilidade de compreender melhor esse quadro: a programação metabólica por meio da redução do tamanho da ninhada. Essa metodologia possibilita o estudo desde a infância, quando é feita a programação metabólica por indução da obesidade na lactação, e durante todo o desenvolvimento até a vida adulta (Argente-Arizón et al., 2016; Mozeš et al., 2014; Plagemann et al.1992). Esse método consiste em manipular o tamanho da ninhada entre o dia do nascimento, no dia pós natal 0 (DPN 0) e o DPN 3, formando: ninhada normal (normal litter, NL), com 10 filhotes, sendo 5 machos e 5 fêmeas, e ninhada reduzida (small litter, SL), com 3 filhotes, sendo 2 machos e 1 fêmea (Plagemann et al.1992). O aumento

da massa corporal na fase de lactação pode ser explicado tanto pelas alterações na composição do leite (aumento do teor lipídico), quanto pela diminuição da competição entre os filhotes e consequente excesso de ingestão do leite (Možeš, 2014). A ingestão de nutrientes é fundamental para manutenção da vida, uma vez que as células necessitam de energia. A homeostase energética possui uma regulação fina e integrada entre diversos tecidos, e os mais importantes são: fígado, musculatura esquelética e tecido adiposo (Jones, 2016; Han et al., 2016).

## 1.2 Fígado na Homeostase Energética

O fígado desempenha um papel fundamental na homeostase energética, uma vez que tem funções importantes no metabolismo de carboidratos e lipídios. Essas funções se alteram de acordo com os diferentes estados metabólicos, como o alimentado e o jejum. Após digestão e absorção dos carboidratos, a glicose chega ao fígado, onde é captada por hepatócitos, por meio de difusão facilitada. Existe alta densidade de GLUT-2 na membrana plasmática do hepatócito, sendo o principal transportador de glicose nesse tecido. O GLUT-2 é independente da insulina, então esse transporte não é regulável diretamente por este hormônio. No estado alimentado, quando há aumento da glicemia e da insulina, há redução da produção hepática de glicose, pela diminuição da glicogenólise e da gliconeogênese. Já no estado de jejum, quando há disponibilidade reduzida de glicose, o glucagon estimula a glicogenólise e a gliconeogênese. Inclusive, o fígado é o principal tecido envolvido na homeostase glicêmica, por sua capacidade de sintetizar glicose a partir da gliconeogênese, que utiliza moléculas como aminoácidos, lactato e glicerol para formar glicose (Nelson & Cox, 2014; Xavier et al., 2013).

O fígado também participa do controle da síntese e oxidação de ácidos graxos. Após a ingestão alimentar, os triacilgliceróis advindos da dieta são absorvidos no intestino delgado e transportados no sangue na forma de quilomícrons a tecidos periféricos, como músculos e tecido adiposo, e também ao fígado. No fígado, esses substratos ficam disponíveis para processos como a lipogênese, no qual os ácidos graxos e gliceróis são convertidos em triacilgliceróis e são armazenados nos hepatócitos. Esses triacilgliceróis podem ser empacotados em lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) para serem transportados do fígado para tecidos periféricos. Os quilomícrons também podem carregar colesterol para o tecido hepático, sendo armazenado por ele. A insulina estimula a síntese de triacilgliceróis (lipogênese) e inibe a lipólise. A síntese de ácidos graxos no fígado (lipogênese) é estimulada pela insulina. A quebra da glicose (via glicolítica), que também é estimulada pela insulina, aumenta a atividade da enzima que participa da

esterificação dos ácidos graxos. Ou seja, a insulina favorece o armazenamento dos ácidos graxos sintetizados (Nelson & Cox, 2014; Aires, 2018).

Em situações de baixa disponibilidade energética como, por exemplo, no jejum, a glicemia fica reduzida. Os estoques de glicogênio hepático são utilizados para fornecer energia, mas duram cerca de 12 horas, e então precisa haver mobilização dos lipídios. Como dito, os hepatócitos também podem armazenar triacilgliceróis, e a lipólise degrada lipídios que estejam no fígado ou no tecido adiposo, liberando ácidos graxos livres para serem utilizados como fonte de energia às células (exceto nas células do sistema nervoso central, que utilizam apenas glicose). A adrenalina, hormônio liberado na condição de hipoglicemia, estimula a lipólise (Nelson & Cox, 2014; Aires, 2018).

### 1.3 Musculatura Esquelética na Homeostase Energética

O músculo esquelético também desempenha um papel significativo no metabolismo glicêmico, contribuindo para a captação e utilização da glicose no organismo. No estado alimentado, há aumento da sinalização insulínica, e nas células do músculo esquelético (os miócitos), há aumento da expressão de GLUT4 (nuclear) e translocação das vesículas contendo GLUT-4 para a membrana celular. Assim, a glicose da corrente sanguínea entra nos miócitos. Para fornecer energia ao músculo, ocorre a glicólise, fornecendo ATP e lactato. Ela ocorre tanto em condições aeróbias quanto anaeróbias, através de enzimas glicolíticas presentes no citoplasma, e isso difere nos tipos de fibras musculares presentes em cada músculo. Os miócitos também possuem capacidade de armazenar glicose na forma de glicogênio, então, em resposta à glicemia aumentada e aumento da insulina, as células musculares fazem glicogênese (Abreu et al., 2016; Pereyra 2022).

Os músculos brancos são ricos em fibras do tipo II. São fibras de contração rápida, pobre em mitocôndrias e são capazes de trabalhar em condições de anaerobiose. Nesses músculos, a preferência de fonte energética é a glicose. O músculo gastrocnêmio (MG) é um dos músculos da panturrilha, localizado na parte posterior da perna, e é composto por fibras musculares mistas: fibras de contração lenta (tipo I) e fibras de contração rápida (tipo II). Por essa composição, o MG é capaz de desempenhar funções diversas. As fibras do tipo IIa possuem características intermediárias quanto ao número de mitocôndrias e enzimas glicolíticas e oxidativas. Enquanto as do tipo IIb são ricas em enzimas glicolíticas (hexoquinase, fosfofrutoquinase, lactato desidrogenase), entre outras (Schiaffino et al., 2011). A glicólise anaeróbia é a principal via glicolítica desse tipo de fibra, uma vez que em exercícios físicos intensos e de curta duração, a obtenção rápida

de ATP a partir da glicose precisa acontecer independente do oxigênio. Neste processo se observa a formação de um produto final estável (lactato) no citoplasma celular (Aires, 2018).

O músculo sóleo (MS) também é um músculo da panturrilha, localizado na parte posterior da perna. O MS é composto principalmente por fibras musculares de contração lenta (tipo I), tornando-o mais resistente à fadiga. São especializadas em atividades de resistência e de longa duração. Elas têm um suprimento sanguíneo mais rico (maior presença de mioglobina) e apresentam maior atividade de enzimas oxidativas (succinato desidrogenase e citrato sintase) e uma maior densidade mitocondrial (Qaisar e Bhaskaran, 2016). A abundância de mitocôndrias e organelas ocorre para a produção de ATP através da respiração celular aeróbica e contribui para sua eficiente produção energética, pois a glicose pode ser totalmente oxidada a  $\text{CO}_2$ , ATP e  $\text{H}_2\text{O}$ , fornecendo energia pela fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial (Nelson & Cox, 2014).

No entanto, se a glicose da alimentação ou da glicogenólise não forem suficientes para suprir a necessidade energética, o músculo também utiliza ácidos graxos, corpos cetônicos e lactato como energia. Isso ocorre também em indivíduos diabéticos, que por terem resistência à insulina, captam poucas moléculas de glicose pelo GLUT-1. Os ácidos graxos e corpos cetônicos são oxidados nas células musculares para entrar no ciclo de Krebs para produção de energia. Em situações de jejum e exercício físico, as catecolaminas ativam principalmente adrenorreceptores  $\beta_2$  para fazer a quebra do glicogênio (glicogenólise).

Dependendo do tipo de músculo e quantidade de massa corporal do indivíduo, há considerável quantidade de tecido adiposo interfibras. O estudo em músculo de indivíduos com obesidade e/ou diabetes tipo 2 demonstra haver baixa capacidade de oxidação de ácidos graxos nos miócitos. Se não são adequadamente oxidados, podem levar ao acúmulo lipídico no músculo, o que tem sido associado à resistência à insulina. Os músculos são os tecidos mais abundantes em proteínas, e são especializados na síntese e degradação destas. A degradação proteica, liberando aminoácidos, podem ser utilizados como precursores de glicose na gliconeogênese hepática em situações de demanda energética (Nelson & Cox, 2014; Aires, 2018).

#### 1.4 Tecido Adiposo na Homeostase Energética

A função do tecido adiposo é armazenar lipídios (triacilgliceróis) quando não houver demanda metabólica, ou mobilizar ácidos graxos quando houver demanda. O



tecido adiposo é dependente da via glicolítica para a esterificação de ácidos graxos, e por isso precisa do metabolismo de carboidratos. No entanto, o transporte de glicose pela membrana do adipócito é predominantemente feito pelo GLUT4, transportador dependente de insulina. A insulina estimula a síntese *de novo* e a captação de lipídios incorporados em lipoproteínas (triacilglicerois de VLDL e quilomícrons são hidrolisados em ácidos graxos e glicerol). Além disso, a insulina inibe a mobilização de ácidos graxos do tecido adiposo e reduz a lipólise (por inibir a enzima lipase hormônio sensível) (Zimmerman et al., 2004; Aires, 2018).

### 1.5 Acúmulo de Tecido Adiposo

O acúmulo de tecido adiposo ocorre, basicamente, quando há maior ingestão nutricional do que o gasto energético (Cherif et al., 2016). Frente ao excesso de calorias ingeridas, o organismo pode lidar de diferentes maneiras: 1) Converter o excesso de energia em lipídios e armazená-lo no tecido adiposo; 2) queimar o excesso energético através de exercício extra; 3) desviar o excesso para a produção de calor (termogênese) pelo desacoplamento das mitocôndrias. O equilíbrio entre a captação e o gasto energético é regulado por um conjunto complexo de sinais hormonais e processos neurais para manter adequada a quantidade de tecido adiposo (Cahill, 2006; Bazotte et al., 2014).

A via, seja biossíntese ou degradação dos triacilglicerois, é regulada dependendo da necessidade. No estado de jejum, há necessidade de mobilização lipídica para suprir as necessidades energéticas, então sua liberação do tecido adiposo é estimulada pelos hormônios glucagon e adrenalina. Os ácidos graxos livres, então, são captados por diversos tecidos, incluindo os músculos, onde são oxidados para a geração de energia. O glicerol também pode ser utilizado como precursor da gliconeogênese no fígado. Já no estado alimentado, quando há aumento da glicemia após ingestão alimentar, a insulina promove a conversão de carboidratos e proteínas em triacilglicerois (Coleman & Mashek, 2011). O excedente da energia proveniente da ingestão de carboidratos, lipídios ou proteínas, é convertido em triacilglicerois e armazenado no tecido adiposo, que podem ser mobilizados quando precisar de energia (Maier et al., 2006).

A qualidade da dieta regula a expressão de genes essenciais para a manutenção da massa corporal. Os receptores ativados por proliferadores de peroxissomos (PPAR) são fatores de transcrição modulados, por exemplo, pela ingestão aumentada de lipídios na dieta (Sharma & Staels, 2007). O PPAR $\delta$  (membro da superfamília PPAR) é um dos reguladores-chave na oxidação dos lipídios, que agem detectando alterações na dieta lipídica. Camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica (high fat diet, HFD),

acumulam grande quantidade de tecido adiposo, além de lipídios no fígado. Mas camundongos que recebem HFD, geneticamente modificado para PPAR $\delta$  ativo, não acumulam lipídeos nos tecido. O PPAR $\delta$  age no fígado e músculos esqueléticos estimulando a transcrição de genes envolvidos na  $\beta$ -oxidação e na dissipação da energia por meio do desacoplamento das mitocôndrias, levando a depleção lipídica, perda de peso e termogênese (Barish et al., 2006; Semple et al., 2006).

Os ácidos graxos em excesso entram nos hepatócitos e miócitos, onde são convertidos em ácidos graxos e glicerol e se acumulam como gotículas lipídicas. Essa deposição ectópica de lipídios pode levar à insensibilidade à insulina no fígado e no músculo. No entanto, há evidências de que alguns indivíduos são menos adaptados geneticamente para lidar com isso, sendo mais susceptíveis ao dano celular que leva ao desenvolvimento do diabetes tipo 2 (Savage et al., 2007; Muoio & Negard, 2008).

Sabe-se que há três tipos diferentes de tecido adiposo: tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo bege (TB). O TAB é o depósito mais abundante do organismo e sua principal função é o armazenamento energético em forma de lipídios (Kusminski et al., 2016; Cohen & Kajimura, 2021). O aumento de deposição lipídica no TAB visceral, como por exemplo o TAB retroperitoneal e o TAB epididimal, está relacionado com distúrbios na homeostase energética (Oikonomou & Antoniadou, 2019). Esses adipócitos têm potencial para armazenar uma quantidade maior de energia, são mais resistentes à insulina e mais propensos à apoptose (Ghaben & Scherer, 2019). Possuem uma única gotícula lipídica, empurrando o núcleo para a periferia da célula (Symonds, 2012).

Já o TAM é encontrado na região interescapular e supraclavicular dos seres humanos, e é um depósito pequeno, comparado ao TAB. A grande diferença entre o TAB e TAM é que, além de possuir múltiplas gotículas de lipídios, os adipócitos do TAM são especializados em dissipar energia na forma de calor independente de tremor (possuem grande quantidade de mitocôndrias que expressam a UCP-1, proteína desacopladora que participa da termogênese), possuem vasta vascularização e inervação do sistema nervoso simpático (Oikonomou & Antoniadou, 2019). Sua atividade serve como mecanismo para manter a temperatura corporal em resposta ao frio, além de contribuir para o balanço energético (Harms & Seale, 2013).

O TB possui as células adiposas beiges, que podem ser encontradas espalhadas entre o TAB. Os adipócitos bege, apesar de origem distinta aos adipócitos marrons, possuem características em comum. O TB também tem múltiplas gotículas lipídicas e possuem mitocôndrias que expressam a UCP-1 (Ikeda et al., 2018), e também

apresentam capacidade termogênica. No entanto, essa capacidade só é expressa nos adipócitos bege quando há estímulos como, por exemplo, exercício físico e frio (Harms & Seale, 2013; Oikonomou & Antoniadou, 2019). Sem estímulo, apresentam características de adipócito branco.

## 1.6 Obesidade e Estresse Oxidativo

Como foi dito anteriormente, a obesidade ocorre quando há um desequilíbrio crônico entre a ingestão e o gasto de energia, que resulta em um acúmulo excessivo de tecido adiposo branco corporal, e esse desequilíbrio possui causas multifatoriais. E neste quadro, além da homeostase energética estar perturbada, há um estado inflamatório crônico de baixo grau (Sippel et al., 2014), aumento do estresse oxidativo (Pérez-Torres et al., 2021) e aumento da secreção de adipocinas, como a resistina, adipocina associada à resistência à insulina (Acquarone et al., 2019). O estado inflamatório, oxidação de ácidos graxos e sobrecarga da atividade mitocondrial, que ocorrem com o excesso de peso, também estão associados ao estresse oxidativo (EO). O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e sua neutralização, que pode levar a danos nos tecidos.

Na fisiopatologia da obesidade, há um importante papel do EO, uma vez que está associada a um desequilíbrio no metabolismo por excesso de nutrientes, uma vez que há aumento da demanda sobre a atividade mitocondrial e a utilização da cadeia de transporte de elétrons, levando a formação de subprodutos metabólicos, como as ERO (Pérez-Torres et al., 2021; Zielińska-Bliźniewska et al., 2019). As mitocôndrias são os locais onde as ERO intracelulares são majoritariamente produzidas, porém estas também podem ser produzidas por organelas como o retículo endoplasmático, lisossomos, peroxissomos e por enzimas citosólicas. São espécies independentes que contêm um ou mais elétrons não pareados (Vasconcelos et al., 2014).

A geração das ERO é um processo contínuo e fisiológico durante os processos metabólicos e, em baixas concentrações, elas têm efeitos benéficos e necessários ao organismo como, por exemplo, na defesa contra microorganismos que são patogênicos mediada pelo sistema imunológico e sinalização intracelular. No entanto, quando essa concentração é alta, as ERO alteram a permeabilidade, fluidez e integridade das membranas celulares, e pode danificar o DNA, lipídios e proteínas, conduzindo a lesões oxidativas (Halliwell, B., 2012; Barbosa et al., 2010). Algumas ERO produzidas são

peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ânion superóxido ( $\text{O}^{2-}$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ) e hipoclorito ( $\text{ClO}^-$ ) (Pérez-Torres et al., 2021).

Na musculatura esquelética, as fibras do tipo II são mais propensas à fadiga e, então, o metabolismo celular pode se tornar menos eficiente para a alta demanda metabólica, levando a um aumento na produção de ERO. Ainda, o aumento da produção de lactato na glicólise anaeróbia, pode reduzir o pH do tecido muscular, leva à acidose láctica, que pode conduzir a uma produção aumentada de ERO como subprodutos metabólicos. Na via oxidativa (fibras tipo I), no entanto, a respiração aeróbia ocorrida nas mitocôndrias permite que haja grande formação de ERO. Isso porque durante a transferência de elétrons na cadeia respiratória mitocondrial, alguns elétrons podem escapar e formar radicais livres. Assim, o processo fisiológico da produção de ATP por essa via pode resultar na geração de ERO. Decorrente desse processo, os tecidos de fibra muscular do tipo I desenvolveram adaptações no sistema antioxidante endógeno, que visam diminuir a possibilidade de lesões oxidativas. O equilíbrio entre a produção de ERO e os mecanismos do sistema antioxidante é fundamental para a homeostase do organismo (Zielinska-Blizniewska et al., 2019).

As ERO podem atingir todos os componentes celulares, porém a membrana celular é mais suscetível, decorrente do processo de peroxidação lipídica (PL), que acarreta em alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas, com perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas (Ferreira et al., 1997). A PL gera subprodutos como malondialdeído (MDA), hidroxinonenal, oxononenal e isoprostanos, que são utilizados como marcadores de rastreamento (Dalle et al., 2006). O grupo de Furukawa et al. (2004), por meio de estudo com diferentes modelos de obesidade em animais, descobriu que o acúmulo excessivo de lipídios nos adipócitos causa um aumento na PL no próprio tecido adiposo. Em humanos com obesidade, foi demonstrado aumento da relação da circunferência da cintura com a presença de subprodutos da PL (Furukawa et al., 2004). Assim, observa-se que, apesar de ser um processo fisiológico, a produção de ERO pode se tornar problemática em determinadas situações.

Estudos anteriores comprovaram a associação entre o excesso de peso com o EO em vários tecidos de animais com obesidade por redução do tamanho da ninhada, como por exemplo: aumento do EO e dano oxidativo no córtex renal de ratos (Pedroza et al., 2018); EO no tecido hepático, que pode ter contribuído para o comprometimento da sinalização insulínica (Conceição et al., 2013); superprodução de ERO mitocondriais no tecido cardíaco, aumentando o risco de doença cardiovascular (Freitas et al., 2018); maior capacidade de início precoce do desequilíbrio oxidativo, favorecendo disfunção hepática

(Conceição et al., 2015). O EO pode causar um aumento tanto na proliferação de pré-adipócitos, quanto na diferenciação de adipócitos e no tamanho dos adipócitos maduros, além de alterar a ingestão alimentar e o peso corporal (Higuchi et al., 2013; Lee et al., 2009). Portanto, a obesidade colabora com a instalação do EO, e quando este está instalado, piora as condições da obesidade, torna mais propício o surgimento de comorbidades e mais difícil a reversão do quadro.

### 1.7 Antioxidantes

Visando a proteção do organismo contra o EO, o sistema antioxidante é uma linha de defesa, cujo objetivo é manter um equilíbrio entre agentes oxidantes (como as ERO) e o sistema antioxidante, ou seja, manter o balanço redox do organismo. Essa defesa pode atuar de duas maneiras por meio de compostos endógenos que: 1. Detoxificam o agente antes que cause a lesão, por meio da glutathione reduzida (GSH), enzimas glutathione-S-transferase (GST), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione-peroxidase (GSH-Px); 2. Reparam a lesão ocorrida, por meio da glutathione-redutase (GSH-Rd), GSH-Px, e da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana (Maciejczyk et al., 2017; Ross & Moldeus, 1991).

Além dos endógenos, existem compostos exógenos que contribuem com essa função. O ácido ascórbico, popularmente conhecido como vitamina C (vitC), apresenta potencial de defesa contra lesões oxidativas. Nos seres humanos, essa vitamina precisa ser obtida através da alimentação ou suplementação, uma vez que não é produzida endogenamente. Já nos ratos, o ácido ascórbico é produzido de forma endógena (Buehler et al., 2007). A vitC desempenha importantes papéis no metabolismo como, por exemplo, sendo cofator de várias enzimas e participa da regeneração da forma reduzida e antioxidante da vitamina E (Halliwell & Gutteridge, 1985). Porém, sua mais importante habilidade é atuar como agente redutor (doador de elétrons) e reduzir metais de transição presentes nos sítios ativos das enzimas ou nas formas livres no organismo (Barreiros et al., 2006).

Foi relatado previamente que a maior parte dos pacientes com obesidade apresenta reduções significativas nas concentrações de vitaminas (Aasheim & Bohmer, 2008), altas concentrações de adipocinas e marcadores de EO, acompanhados da redução do sistema antioxidantes (Lubrano et al., 2015). Além disso, um estudo populacional europeu mostrou que as concentrações plasmáticas de vitC foram inversamente proporcionais à adiposidade central (Canoy et al., 2005). Essas evidências

demonstram que o estudo com suplementação de vitC em modelos de obesidade se faz relevante.

Nesse sentido, foi demonstrado que a suplementação com vitamina C reduz danos ao tecido cerebral, cerebelar, cardíaco e hepático de ratos estressados, através da inibição da oxidação lipídica e melhora do sistema de defesa antioxidante (Esrefoglu et al., 2016) e reduz o dano oxidativo no hipocampo de ratos que, durante a gestação e lactação, foram expostos a baixos níveis de chumbo (Chang et al., 2012). A suplementação de vitC também inibe a progressão dos processos neurodegenerativos e alterações comportamentais relacionados com a Doença de Alzheimer em ratos (Olajide et al., 2017); reduz a hepatotoxicidade induzida por nitrilotriacetato férrico em ratos (Ansar & Iqbal, 2015) e reduz a produção de ERO em adipócitos isolados de ratos (Garcia-Diaz et al., 2010). Na obesidade, a vitamina C, reduz a resistência insulínica em ratos obesos por HFD (Tranberg et al., 2018); apresenta efeito lipolítico e antioxidante em ratas com obesidade induzida por ovariectomia (Kim et al., 2018) e reduz o estresse oxidativo no fígado e tecido adiposo branco de ratos com obesidade induzida por HFD (Drehmer et al., 2019). Ainda, já foi observado que a vitamina C é capaz de modular a ligação de NF- $\kappa$ B ao DNA celular, levando a uma redução da resposta inflamatória (Garcia-Diaz et al., 2015; Ellulu, 2017).

Entretanto, existe uma lacuna na literatura sobre o tratamento com vitC em ratos com obesidade induzida por redução do tamanho da ninhada. Dessa forma, seria possível que a suplementação de vitC por 30 dias, durante a vida adulta de ratos programados metabolicamente por redução do tamanho da ninhada, seja capaz de amenizar os danos causados pelo excesso de peso?

A hipótese do trabalho é de que: no início da vida adulta (DPN 60), animais com supernutrição lactacional apresentará peso corporal elevado, maior adiposidade, dislipidemias e alteração de perfil glicêmico, decorrentes da programação metabólica por supernutrição no período lactacional. Essa obesidade leva à instalação de inflamação de baixo grau e estresse oxidativo, com danos teciduais, o que contribui para as disfunções metabólicas. Além disso, hipotetiza-se que a intervenção com o tratamento de vitamina C durante a fase adulta (DPN 90), por 30 dias, é capaz de mitigar os efeitos negativos da programação metabólica por supernutrição lactacional.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Considerando que: 1. A indução da obesidade por supernutrição neonatal por redução do tamanho da ninhada causa alterações que se estendem da infância à vida adulta; 2. O excesso de nutrientes e adiposidade relacionam-se ao aumento da inflamação e com a instalação do EO, favorecendo o surgimento de lesões oxidativas e comorbidades; 3. Há evidências na literatura de que o EO pode ser atenuado com a suplementação de compostos antioxidantes; faz-se relevante avaliar os efeitos do antioxidante exógeno, vitC, na homeostase energética, perfil oxidativo e inflamatório em ratos adultos com obesidade induzida por supernutrição neonatal induzida pela redução do tamanho da ninhada.

## **3. OBJETIVOS**

1. Avaliar em animais provenientes de NL e SL, sem tratamento, aos 60 dias de vida. O objetivo deste protocolo foi compreender o estado metabólico e dos sistemas oxidante e antioxidante no período pré-intervenção de tratamento com vitC (estudo 1).
2. Avaliar os efeitos do tratamento com vitC por 30 dias, durante a vida adulta (DPN 60-89), em animais SL. O objetivo deste protocolo foi responder quais (e se) os parâmetros metabólicos e o balanço redox foram afetados em animais SL pelo tratamento com vitC.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Animais**

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar obtidos por meio de cruzamento de 29 matrizes provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), com 10 machos experientes. No dia do nascimento, DPN 0, o tamanho da ninhada foi ajustado. Para formar a ninhada reduzida (SL), objeto do estudo, foram mantidos 3 filhotes, sendo 2 machos e 1 fêmea. Na ninhada normal (NL), controle, foram mantidos 10 filhotes, sendo 5 machos e 5 fêmeas (Plagemann et al.1992). Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. Após o desmame, as fêmeas foram remanejadas para outro projeto. Foram mantidos 4-5 machos por caixa coletiva no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas. Ambiente de luz (ciclo 12 h

claro/escuro) e temperatura ( $22 \pm 2$  °C) foram controladas; água e alimentação (dieta padrão Nuvilab CR-1, NUVITAL®) foi à vontade, exceto às horas de restrição alimentar que precederam o GTT e eutanásia. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação (PROTOCOLO CEUA no 024/2020, OF. CIRC. CEUA no 87/2020).

## 4.2 Drogas

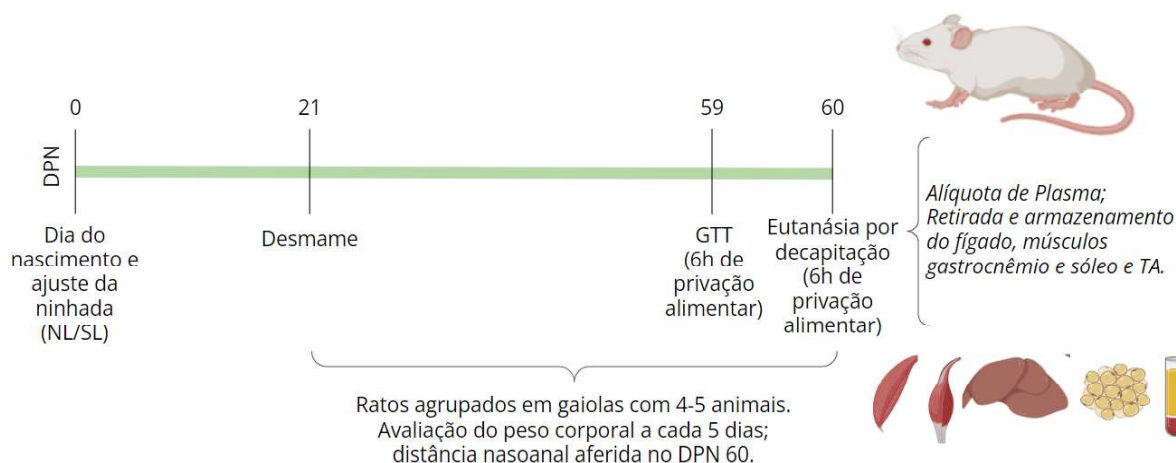
Para o tratamento, utilizou-se a vitamina C (L-ascorbic Acid, Sigma-Aldrich), reconstituída diariamente, tendo como veículo a água corrente, e armazenada protegida da luz. A administração foi realizada por via oral, por gavagem, na concentração de 100 mg/dia de rato (Siervo et al., 2015). Para o tratamento (DPN 60-89), o volume final diário foi de 1 mL por animal.

## 4.3 Protocolos Experimentais

4.3.1 ESTUDO 1: Avaliação de animais com obesidade induzida por supernutrição neonatal por redução do tamanho da ninhada no DPN 60.

Como pode ser observado na Figura 1, após a determinação das ninhadas NL e SL no DPN 0, os animais foram pesados a cada três dias até o DPN 21, quando ocorreu o desmame. O peso corporal e a ingestão alimentar foram aferidos a cada 5 dias até o DPN 60. No DPN 59, após restrição alimentar de 6 horas, o GTT foi realizado. Ao final deste procedimento, a ração foi novamente ofertada aos animais (De Souza et al., 2018). No DPN 60, foi feita a aferição da medida naso-anal para posterior cálculo do índice de Lee (Bernardis & Patterson, 1968). Após 6 horas de restrição alimentar, foi realizada a eutanásia por decapitação às 14h. Após a eutanásia, o sangue foi coletado em tubos heparinizados, centrifugados a 3000 r.p.m. a 4 °C durante 20 minutos, e o plasma separado em alíquotas e armazenado a -20 °C para posteriores dosagens de colesterol total, HDL, LDL, triacilgliceróis, glicose e ácido úrico. Os tecidos adiposos viscerais retroperitoneal e epididimal foram retirados, pesados e armazenados para posterior análise. O fígado, músculo gastrocnêmio e sóleo foram retirados e armazenados para posteriores análises. A porção seccionada do MG foi superficial e média, cuja aparência macroscópica permite identificar a predominância de fibras brancas (Hayasaki et al., 2001).

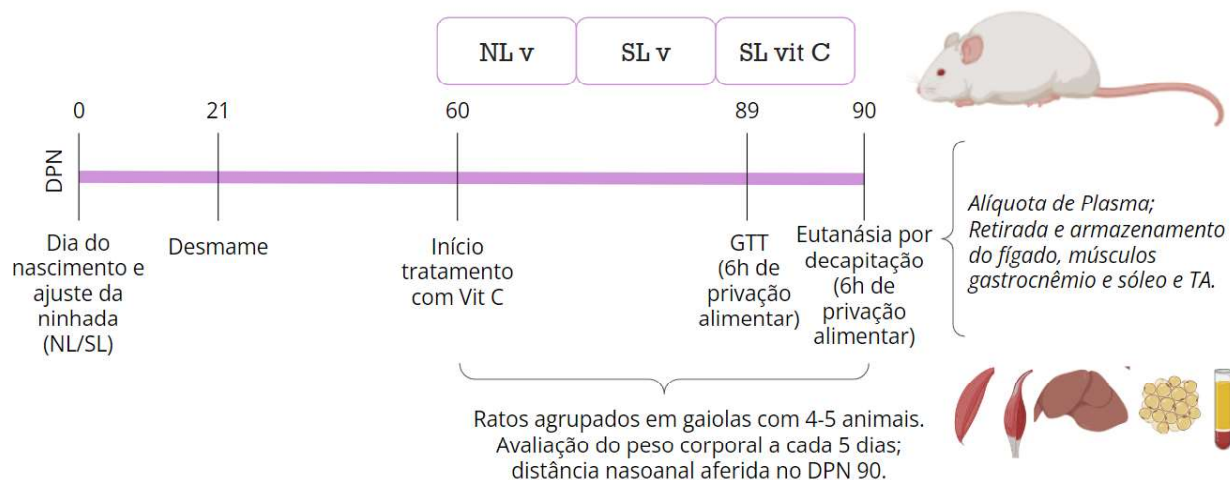




**Figura 1.** Linha do tempo do Estudo 1.

**4.3.2 ESTUDO 2:** Avaliação dos efeitos do tratamento com vitC na vida adulta (DPN 60-89) de animais com obesidade induzida por supernutrição neonatal por redução do tamanho da ninhada.

Como pode ser visto na Figura 2, após a determinação das ninhadas NL e SL no DPN 0, os animais foram pesados a cada três dias até o DPN 21, quando ocorreu o desmame. Após o desmame, o peso corporal e ingestão alimentar foram aferidos a cada 5 dias, até o DPN 60, quando o tratamento foi iniciado com água corrente, o veículo de dissolução (v), ou vitamina C (vitC). Para isso, 3 grupos foram formados: 1) NLv; 2) SLv; 3) SLvitC. O tratamento foi feito diariamente por 30 dias, do DPN 60-89, por via oral (gavagem). Durante os 30 dias, diariamente aferiu-se peso corporal e ingestão alimentar. No DPN 89, após 6 horas de restrição alimentar, foi realizado o GTT, e ao final deste procedimento a ração foi novamente ofertada aos animais. No DPN 90, a medida naso-anal foi aferida para posterior cálculo do índice de Lee. Após 6 horas de restrição alimentar, foram submetidos à eutanásia por decapitação às 14h. Após a eutanásia, os mesmos tecidos do estudo 1, além do sangue, foram coletados e armazenados para posteriores análises.



**Figura 2.** Linha do tempo do Estudo 2.

#### 4.4 Perfil Morfofisiológico

##### 4.4.1 Aferição do peso corporal

A partir do DPN 0, os animais foram pesados a cada 3 dias até o DPN 21, quando foi feito o desmame. Após o desmame, os animais foram pesados a cada 5 dias até o DPN 60 (protocolo 1). No estudo 2, os animais foram pesados diariamente desde o início do tratamento, no DPN 60, e até o DPN 90.

##### 4.4.2 Cálculo da ingestão alimentar

Para analisar a ingestão alimentar de animais NL vs. SL (estudo 1), o cálculo foi adaptado à quantidade de dias entre as aferições. a) Ingestão alimentar diária/100g do DPN 21 ao 60:  $= (\Delta \text{peso} / 25) / \text{peso do animal na última pesagem}$ , quando havia 5 animais na caixa coletiva, por 5 dias. b) Ingestão alimentar diária/100g do DPN 21 ao 60:  $= (\Delta \text{peso} / 20) / \text{peso do animal na última pesagem}$ , quando havia 4 animais na caixa coletiva, por 5 dias.

Para analisar a ingestão alimentar de animais NL veículo vs. SL veículo, NL veículo vs. SL Vit C, SL veículo vs. SL Vit C (estudo 2), o cálculo também foi adaptado à quantidade de dias entre as aferições. a) Ingestão alimentar diária/100g do DPN 60 a 89:  $= (\Delta \text{peso} / 5) / \text{peso do animal na última pesagem}$ , quando havia 5 animais na caixa

coletiva. b) Ingestão alimentar diária/100g do DPN 60 ao 89:  $= (\Delta \text{peso} / 4) / \text{peso do animal na última pesagem, quando havia 4 animais na caixa coletiva.}$

#### 4.4.3 Cálculo do índice de Lee

Para mensurar o índice de massa corporal de animais, mimetizando os resultados obtidos pelo Cálculo de Índice de Massa Corporal (IMC) de humanos, foi calculado o Índice de Lee. Esta é uma forma acurada e rápida de medir o grau de obesidade em experimentos submetidos a um método de ganho de peso corporal (Malafaia et al., 2013). O índice foi calculado dividindo a raiz cúbica do peso corporal em gramas pelo comprimento naso-anal em centímetros (Bernardis & Patterson, 1968).

#### 4.4.4 Análise histológica de adipócitos do TAE e TAR

Os tecidos adiposos retroperitoneal e epididimal foram retirados após eutanásia, pesados e armazenados em microtubos contendo paraformaldeído 4% como fixador. Os tecidos foram posteriormente incluídos em parafina, e os blocos microtomizados em cortes não seriados de 12µm. As lâminas, com 3 cortes cada, foram coradas em hematoxilina e eosina. As análises foram feitas em fotomicroscópio, com aumento de 100x e 3 imagens por animal foram analisadas. Foi avaliado o diâmetro médio de  $\approx 200$  adipócitos. A metodologia foi realizada no Laboratório de Análise Histopatológica do Professor Dr. Fábio Goulart de Andrade.

#### 4.4.5 Peso de TAE, TAR, MG e MS

Após a eutanásia, os tecidos foram dissecados, retirados e pesados. Para normalização do peso do tecido pelo peso do animal, calculou-se:  $= 100 * \text{peso do tecido} / \text{peso corporal do animal}$ . Resultado expresso como g/100g.

#### 4.4.6 Dosagem plasmática de ácido úrico

O excesso de tecido adiposo pode levar a um aumento na produção de ácido úrico e à redução da excreção renal deste composto. Além disso, quando as células musculares são danificadas, como durante exercícios intensos ou lesões musculares, as purinas liberadas dessas células podem levar a um aumento na produção de ácido úrico

(Hira et al., 2012). Foi utilizado o Kit Ácido Úrico Enzimático, Vida Biotecnologia, Lote=22/1990.

#### 4.5 Perfil Lipídico

A dislipidemia, um quadro clínico definido por concentrações anormais de lipídios ou lipoproteínas sanguíneas, tem a obesidade como fator de risco para seu desenvolvimento (Santos, 2001). Portanto, a espectrofotometria foi utilizada para as determinações das concentrações plasmáticas de colesterol total e suas frações, e triacilgliceróis por meio de Kits comerciais.

##### 4.5.1 Colesterol total

Através do kit comercial Colesterol total enzimático, Vida Biotecnologia, foi realizada a dosagem plasmática de colesterol total, que afere a união de três tipos de colesterol: o HDL, LDL e o VLDL.

##### 4.5.2 Colesterol HDL

Através do kit comercial Colesterol HDL enzimático, Vida Biotecnologia, foi feita a dosagem do HDL, que é uma lipoproteína de alta densidade. Ela tem a capacidade de remover o colesterol dos tecidos e conduzi-lo para o fígado para metabolização hepática e posterior excreção. O HDL é popularmente conhecido como “colesterol bom”, por ser um fator de proteção, uma vez que está associado com redução de doenças cardiovasculares (Sociedade Brasileira de Cardiologia, 2001).

##### 4.5.3 Colesterol LDL

Para a dosagem de colesterol LDL, foi utilizado o kit Comercial LDL Colesterol, Biotécnica, Ref. 10.015.00. O LDL é uma lipoproteína de baixa densidade, sintetizada no fígado. O aumento do LDL está associado ao acúmulo de colesterol, inclusive no interior de vasos sanguíneos, dificultando o fluxo sanguíneo. O LDL é popularmente conhecido como “ruim” por trazer riscos cardiovasculares (Faludi et al., 2017).

#### 4.5.4 Triacilgliceróis

O kit comercial Triglicérides, Bioliquid, Ref. 743191, foi utilizado para dosagem plasmática de triacilgliceróis. Podem ser encontrados na corrente sanguínea, de forma livre, ou através do colesterol VLDL. Eles são armazenados em grandes quantidades nos adipócitos. Armazenar os triacilgliceróis como combustível é uma vantagem biológica, considerando que a oxidação de um grama de triacilgliceróis libera mais do que o dobro de energia do que a oxidação de um grama de carboidratos (Nelson & Cox, 2014). Seu excesso está associado à síndrome metabólica, obesidade e problemas cardiovasculares.

### 4.6 Perfil Glicêmico

#### 4.6.1 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Esta análise tem como objetivo avaliar a resposta das células beta pancreáticas e a resistência à insulina, e consequentemente determinar o quadro de pré-diabetes ou diabetes melito. No GTT, uma gota de sangue da cauda do animal foi coletada para determinação da glicemia por meio da fita teste do aparelho Accu-Check Advantage II de determinação de glicose sanguínea. A primeira aferição representou a glicemia basal. Imediatamente após, a glicose 25% na dose de 1,0 g/kg de peso corporal foi administrada por via intraperitoneal. A partir disso, foram realizadas dosagens da glicemia pela fita teste nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Transcorridos os 120 minutos, os animais retornaram para suas caixas com alimentação e fluidos à vontade (De Souza et al., 2018).

#### 4.6.2 Glicose plasmática

A obesidade está relacionada com alterações na glicemia em jejum, e para isso foi realizada a determinação das concentrações plasmáticas de glicose, pelo kit comercial Glicose enzimática, Vida Biotecnologia.

#### 4.6.3 Índice de TyG

O índice triacilgliceróis-glicose (TyG) é utilizado como marcador de resistência à insulina (Hosseini, 2017). Dessa forma, o cálculo foi realizado no presente estudo, da seguinte maneira:  $= \ln(\text{concentração plasmática de glicose} * \text{concentração plasmática de triglicérides})/2$ .

#### 4.7 Análise das Fontes Energéticas do Fígado, Músculo Gastrocnêmio e Músculo Sóleo

Os órgãos foram cortados, pesados e colocados em microtubos. Após acrescentar o Reagente de Folch [clorofórmio (2), metanol (1)], cada órgão foi macerado (tubo A) e então centrifugado a 10.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante foi transferido do tubo A para o tubo B. No tubo B, foi adicionado 5x volume do tecido de água com NaCl 0,73%, foi agitado no vórtex por 10 segundos, e então ocorreu a separação de fases. O sobrenadante do tubo B foi transferido para o tubo C. O conteúdo dos tubos B foi evaporado na estufa a ~60° C e então ressuspendeu-se com etanol PA 2x.

O tubo A, contendo o restante do tecido macerado, foi lavado com 5X volume do tecido em etanol 66% com sulfato de sódio 0,73%. Os tubos foram agitados no vórtex por 10 segundos e então centrifugados a 10.000 rpm por 2 minutos. O sobrenadante do tubo A foi transferido para o tubo C.

Ao tubo A foi adicionado 5X volume do tecido de NaOH 20%, e à estufa a 100°C por aproximadamente 10 minutos. Após esse tempo, aguardou-se o resfriamento e foi adicionado 8x volume de Etanol PA. Os tubos foram agitados no vórtex por 10 segundos e foram centrifugados a 12.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. Foi feita a ressuspensão do pellet em 30 x volume de água destilada (Protocolo adaptado por Pedro Tenório, 2023, adaptação de Van Handel, 1965; Reichl et al., 2020; Schaubroek et al., 2022).

O tubo C é composto do sobrenadante do tubo B e do sobrenadante da segunda centrifugação do tubo A.

##### 4.7.1 Concentração de glicose

O conteúdo dos tubos C foram pipetados em microplaca, e para determinação de glicose no tecido, utilizando-se o kit comercial Glicose enzimática, Vida Biotecnologia, e absorbância medida espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como mg/dL.

##### 4.7.2 Concentração de glicogênio

O conteúdo dos tubos A foram pipetados em novo microtubo e realizou-se o método de ácido sulfúrico-fenol, gerando uma solução de cor laranja, cuja absorbância foi medida espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como mg/dL.

#### 4.7.3 Concentração de colesterol e triacilgliceróis

O conteúdo dos tubos B foram pipetados em microplaca, e os kits comerciais Colesterol enzimático, Vida Biotecnologia, Triglicérides, Bioliquid, e foram utilizados para determinação de colesterol e triacilgliceróis, e a absorbância foi medida espectrofotometricamente. Os resultados foram expressos como mg/dL.

#### 4.8 Perfil Oxidativo

Os fragmentos do fígado e músculos sóleo e gastrocnêmio (porção branca), congelados em freezer -80 °C, foram homogeneizados com um homogeneizador Ultra Turrax (Marconi) e homogeneizados em três diferentes tampões:

- 1) Solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2: para determinar a concentração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), glutathione S-transferase (GST), glutathione reduzida (GSH), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Foi feita a quantificação proteica com o método de Bradford (Bradford, 1976) e, então, normalizados para a concentração de proteína de 1 mg/mL. Essas análises foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Toxicologia e Distúrbios Metabólicos da Reprodução da Professora Dr<sup>a</sup> Glaucia Scantamburlo Alves Fernandes.
- 2) EDTA 2mM: para determinar a redução de NBT. Foi feita a quantificação proteica com o método de Bradford (Bradford, 1976) e cálculo para normalização.
- 3) KCl 1,15%: para determinar a concentração de FRAP e ABTS. Foi feita a quantificação proteica com o método de Bradford (Bradford, 1976) e cálculo para normalização. As análises dos itens 2 e 3 foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Pesquisa em Dor, Neuropatia e Inflamação do Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior.

##### 4.8.1 Ensaio de TBARS

Para avaliação da peroxidação lipídica, um parâmetro que sinaliza estresse oxidativo, foi medida a concentração de malondialdeído (MDA). Este é um produto intermediário da peroxidação lipídica, utilizando o método TBARS (Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), descrito por Federici et al., 2007. Utilizando espectrofotometria, foi

determinada a diferença entre a absorbância das leituras em 535 e 572 nm. Os resultados foram expressos como nmol MDA/mg de proteína (Federici et al., 2007).

#### 4.8.2 Redução de NBT

O NBT (nitroblue tetrazolium) é um rastreador de estresse oxidativo. Esse ensaio avalia a redução do NBT através do ânion superóxido. Quanto maior a redução do NBT, mais espécies reativas de oxigênio tem no tecido (Pinho-Ribeiro et al., 2015).

#### 4.8.3 GST

A glutathione s-transferase (GST) faz parte do sistema antioxidante endógeno. Essa enzima intercepta os oxidantes/xenobióticos que são conjugados com a GSH, e facilitam sua eliminação da célula. De acordo com o método descrito por Keen et al., 1976, a atividade enzimática da glutathione s-transferase foi avaliada por espectrofotometria utilizando GSH, 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e tampão fosfato de potássio. A absorbância foi medida em 340 nm em intervalos de 40 segundos durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em mM/mg de proteína (Keen et al., 1976).

#### 4.8.4 GSH

A concentração de glutathione reduzida (GSH) faz parte do sistema antioxidante endógeno. Essa molécula tem a habilidade de doar elétrons a outros compostos, como os radicais livres, para que eles sejam menos reativos. A GSH foi determinada utilizando ácido 5,5'-ditiobis 20-nitrobenzóico no homogenato. As absorbâncias foram medidas a 412 nm e os resultados foram expressos em µg/mg de proteína (Rahman et al., 2007, com adaptações).

#### 4.8.5 Atividade da catalase

A catalase é uma enzima presente principalmente nos peroxissomos e possui íon ferro no sítio ativo, que reage com o peróxido de hidrogênio formando água e oxigênio, sendo assim, parte do sistema antioxidante endógeno. A atividade enzimática da catalase foi determinada baseada no princípio da dismutação do peróxido, e a absorbância foi medida em 240 nm (intervalos de 15 segundos por 1 min 27), descrito por Aebi et al., 1974. Os resultados foram expressos em mM/mg de proteína.



#### 4.8.6 Atividade da superóxido dismutase

A enzima superóxido dismutase catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo compostos bem menos reativos. É parte do sistema antioxidante endógeno. Para avaliação da atividade enzimática da SOD, os homogenatos foram utilizados como fonte da enzima. A reação consiste em quantificar o complexo formado entre os ânions superóxido pela adição de nitroazul tetrazólio (NBT), 96  $\mu$ M, e cloridrato de hidroxilamina ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ), 20 mM, com coloração amarela e a redução de NBT, formando uma leitura de cor azul em 560 nm. As amostras foram lidas a cada 15 segundos por 2 minutos (Senthilkumar et al., 2021). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

#### 4.8.7 FRAP

O método Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) é utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de uma amostra. A reação mede a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) para um produto colorido. A reação detecta compostos com potencial redox  $< 0,7\text{V}$  (o potencial redox do  $\text{Fe}^{+3}$ - TPTZ). O poder redutor mostra estar relacionado com o grau de hidroxilação e extensão de conjugação em polifenóis. Quanto maior a concentração de FRAP, maior o poder redutor presente no plasma. Os resultados foram expressos em nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína (Pinho-Ribeiro et al., 2015).

#### 4.8.8 ABTS

Os ensaios utilizando o radical ABTS são baseados na habilidade dos antioxidantes em sequestrar o ânion radical de longa vida  $\text{ABTS}^{\cdot-}$ . Neste ensaio, o ABTS é oxidado pelo radical peroxil ou outros oxidantes para seu radical cátion,  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ , que é intensamente colorido, e a capacidade antioxidante é medida pela habilidade que o composto em teste possui em decrescer a cor reagindo diretamente com o radical  $\text{ABTS}^{\cdot+}$ . Os resultados foram expressos em nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína (Pinho-Ribeiro et al., 2015).

#### 4.9 Citocinas Pró-Inflamatórias

Sabe-se que o sobrepeso e a obesidade estão relacionados com o aumento de citocinas pró-inflamatórias. Dessa forma, foi analisada a expressão do RNAm das

citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por PCR em tempo real no fígado e músculos gastrocnêmio e sóleo. Para tanto, o RNA total foi isolado a partir da amostra de cada um destes órgãos 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 microplacas 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  $\mu$ L (4  $\mu$ 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. As sondas utilizadas para cada gene foram: Rn01410330\_m1 (IL6), Rn00580432 (IL1b), Rn99999017\_m1 (TNF), e Rn01412977\_g1 (beta-actina). A determinação das concentrações de genes transcritos em cada amostra foi obtida pelo método  $\Delta\Delta C_t$ . Para cada amostra, o ciclo limiar ( $C_t$ ) foi determinado e normalizado com a média do gene de referência ( $\Delta C_t = C_{t_{amostra}} - C_{t_{gene\ de\ referência}}$ ). A variação da expressão de RNAm nas amostras em relação ao grupo controle foi calculada como  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ , em que  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{amostra}} - \Delta C_{t_{controle}}$  (Livak & Schmittgen, 2001). Desta forma, o resultado obtido representa a expressão relativa de RNAm do gene de interesse (unidades arbitrárias).

#### 4.10 Análises Estatísticas

Os dados passaram por uma análise exploratória de normalidade (Shapiro-Wilk test) e homogeneidade de variância (Levene test). No Estudo 1, foi comparado NL vs. SL. Ao passar no teste de normalidade ( $p > 0,05$ ), foi realizado o teste t de Student. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Quando os dados não passaram no teste de normalidade, foi realizado o teste de Mann-Whitney, e os dados foram expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil.

No Estudo 2, foi comparado: NL veículo vs. SL veículo, NL veículo vs. SL vitamina C, e SL veículo vs. SL vitamina C. Ao passar no teste de normalidade ( $p > 0,05$ ), foi realizado o teste ANOVA de uma via, seguido do pós-teste de Tukey. Na curva de peso corporal e no GTT, o teste ANOVA de medidas repetidas foi utilizado. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Quando os dados não passaram no teste de normalidade, foi realizado o teste de Kruskal Wallis, seguido do pós-teste de Dunn, e

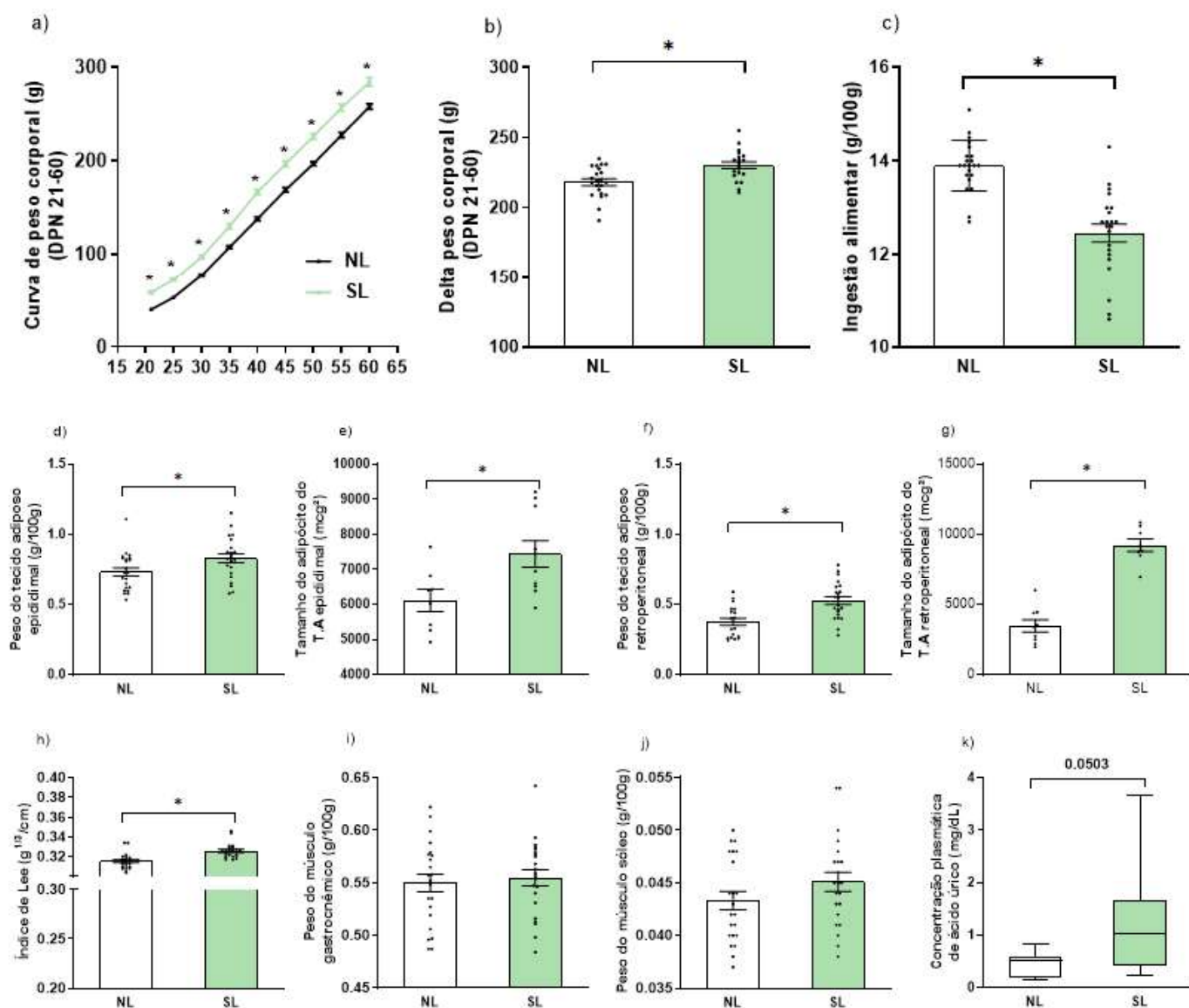
os dados foram expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ESTUDO 1: Avaliação de Animais com Obesidade Induzida por Supernutrição Neonatal por Redução do Tamanho da Ninhada no DPN 60.

#### 5.1.1 Perfil morfofisiológico

Houve interação entre as variáveis grupo (NL ou SL) e dias no peso corporal [ $F(8, 336) = 5,644$ ,  $p < 0,0001$ ]. A redução do tamanho da ninhada levou ao maior peso corporal em todo período de avaliação, assim como o delta peso de 21-60 foi maior no grupo SL (Figura 3a, b; Tabela 1). Apesar do maior peso corporal, a ingestão alimentar foi menor neste grupo (Figura 1c; Tabela 1). A adiposidade também foi maior no grupo SL, tanto no peso do tecido adiposo epididimal (TAE), quanto no peso do tecido adiposo retroperitoneal (TAR) (Figura 3d, f; Tabela 1). O tamanho dos adipócitos de ambos os tecidos, TAE e TAR, foi maior no grupo SL (Figura 3e, g; Figura 4a, b, c, d; Tabela 1). O índice de Lee também foi maior no grupo SL (Figura 3h; Tabela 1). Em contrapartida, os pesos do músculo gastrocnêmio (MG) e músculo sóleo (MS) não foram diferentes entre os grupos (Figura 3i, j; Tabela 1). Adicionalmente, houve uma tendência de aumento das concentrações plasmáticas de ácido úrico nos animais SL, em comparação aos NL (Figura 3k; Tabela 1).

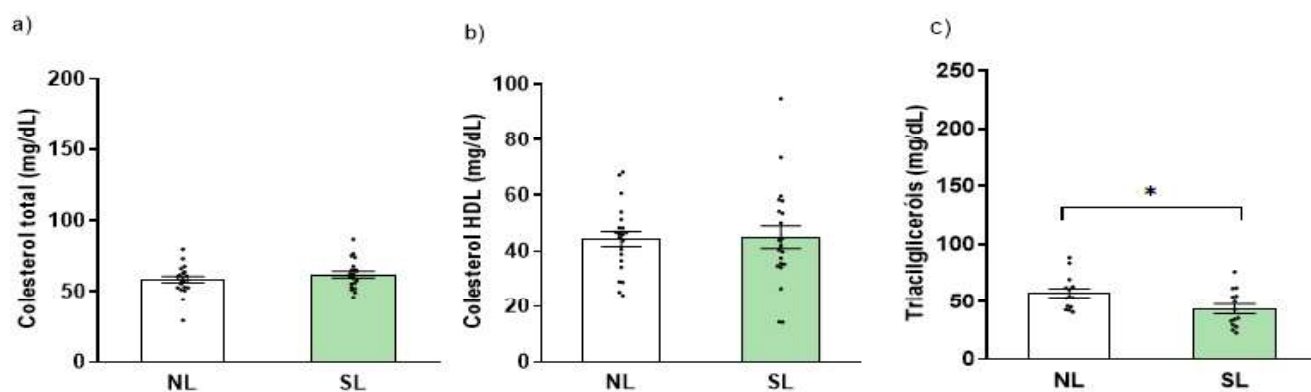


**Tabela 1.** Descrição estatística do perfil morfométrico dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T.  $P<0.05$ .

| Variável                                     | Grupo NL                      | Grupo SL                   | p                  | t     | df | U  | teste                 |
|----------------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|--------------------|-------|----|----|-----------------------|
| Delta peso 21-60                             | 218,2±2,355, n=22             | 230,2±2,453, n=20          | <u>0,0011*</u>     | 3,52  | 40 | -  | Teste T               |
| Ingestão alimentar (g/100g)                  | 13,90±0,115, n=22             | 12,46±0,192, n=22          | <u>&lt;0,0001*</u> | 6,407 | 42 | -  | Teste T               |
| Peso do TA epididimal (mg/100g)              | 0,734±0,029 n=22              | 0,830±0,031, n=22          | <u>0,0314*</u>     | 2,226 | 42 | -  | Teste T               |
| Peso do TA retroperitoneal (mg/100g)         | 0,376±0,025, n=19             | 0,526±0,028, n=22          | <u>0,0004*</u>     | 3,903 | 39 | -  | Teste T               |
| Tamanho do adipócito TAE (mcg <sup>2</sup> ) | 6116±317,8, n=8               | 7445±378,3, n=10           | <u>0,0192*</u>     | 2,604 | 16 | -  | Teste T               |
| Tamanho do adipócito TAR (mcg <sup>2</sup> ) | 3475±433,7, n=9               | 9230±451,1, n=8            | <u>&lt;0,0001*</u> | 9,186 | 15 | -  | Teste T               |
| Índice de Lee (g <sup>1/3</sup> /cm)         | 0,315±0,0016, n=22            | 0,325±0,0016, n=22         | <u>&lt;0,0001*</u> | 4,49  | 42 | -  | Teste T               |
| Peso MG (g/100g)                             | 0,549±0,008, n=22             | 0,554±0,007, n=22          | 0,6694             | 0,43  | 42 | -  | Teste T               |
| Peso MS (g/100g)                             | 0,043±0,001, n=22             | 0,045±0,001, n=22          | 0,1654             | 1,412 | 42 | -  | Teste T               |
| Ácido úrico (md/dL)                          | 0,5215 (0,1905; 0,5705), n=10 | 1,028 (0,4233; 1,671) n=12 | <u>0,0503*</u>     | -     | -  | 30 | Teste de Mann-Whitney |

### 5.1.2 Perfil lipídico

Não houve diferença estatística entre os grupos NL e SL nas concentrações plasmáticas de colesterol total e colesterol HDL (Figura 4a, b; Tabela 2). Porém, o grupo SL apresentou menor concentração plasmática de triacilgliceróis (Figura 4c; Tabela 2).



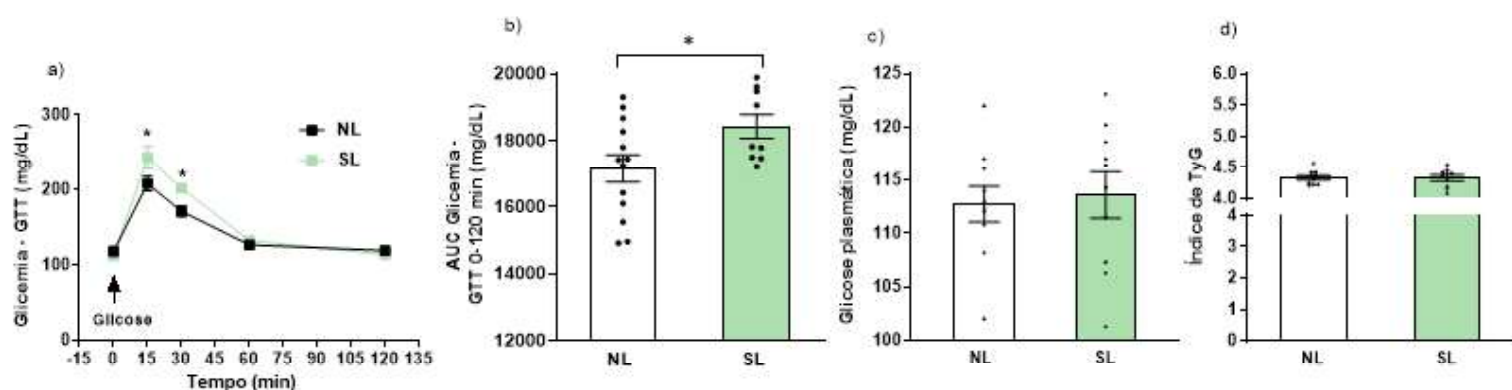
**Figura 4. Perfil lipídico dos grupos NL e SL no DPN 60:** Concentração de colesterol total plasmático (mg/dL) (a), Concentração de colesterol HDL plasmático (mg/dL) (b), Concentração de triacilgliceróis plasmáticos (mg/dL) (c), dos grupos NL e SL no DPN 60. (n=14-21/grupo). Teste T. Dados expressos como média±EPM.  $P<0.05$ .

**Tabela 2.** Descrição estatística do perfil lipídico dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T.  $P<0.05$ .

| Variável                 | Grupo NL          | Grupo SL          | p             | t      | df | teste   |
|--------------------------|-------------------|-------------------|---------------|--------|----|---------|
| Colesterol total (ug/dL) | 58,50±2,309, n=21 | 62,11±2,317, n=20 | 0,2766        | 1,104  | 39 | Teste T |
| Colesterol HDL (ug/dL)   | 4,28±2,676, n=21  | 5,01±4,024, n=21  | 0,8795        | 0,1525 | 40 | Teste T |
| Triacilgliceróis (ug/dL) | 57,51±4,01, n=14  | 43,59±4,380, n=14 | <u>0,027*</u> | 2,343  | 26 | Teste T |

### 5.1.3 Perfil glicêmico

No teste de tolerância à glicose, houve interação entre as variáveis grupo (NL ou SL) e tempo na glicemia [ $F(4, 80)=4,968$ ,  $p=0,0013$ ]. O grupo SL apresentou maior glicemia após 15 e 30 minutos da sobrecarga intraperitoneal de glicose (Figura 5a; Tabela 3). Da mesma maneira, a área sob a curva do GTT (AUC do GTT) foi maior no grupo SL (Figura 5b; Tabela 4). Não houve diferença estatística na glicose plasmática e no índice de TyG entre os grupos (Figura 5c, d; Tabela 4).



**Figura 5. Perfil glicêmico dos grupos NL e SL no DPN 60:** Curva de glicemia no GTT (mg/dL) (a), Área sob a curva do GTT (b), Concentração de glicose plasmática (mg/dL) (c), Índice de TyG (d) dos grupos NL e SL no DPN 60. (n=10-13/grupo). Teste T ou teste ANOVA de medidas repetidas. Dados expressos como média±EPM. P<0.05.

**Tabela 3.** Descrição estatística do GTT dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média para teste Two Way ANOVA, com pós teste de Sidak. P<0.05.

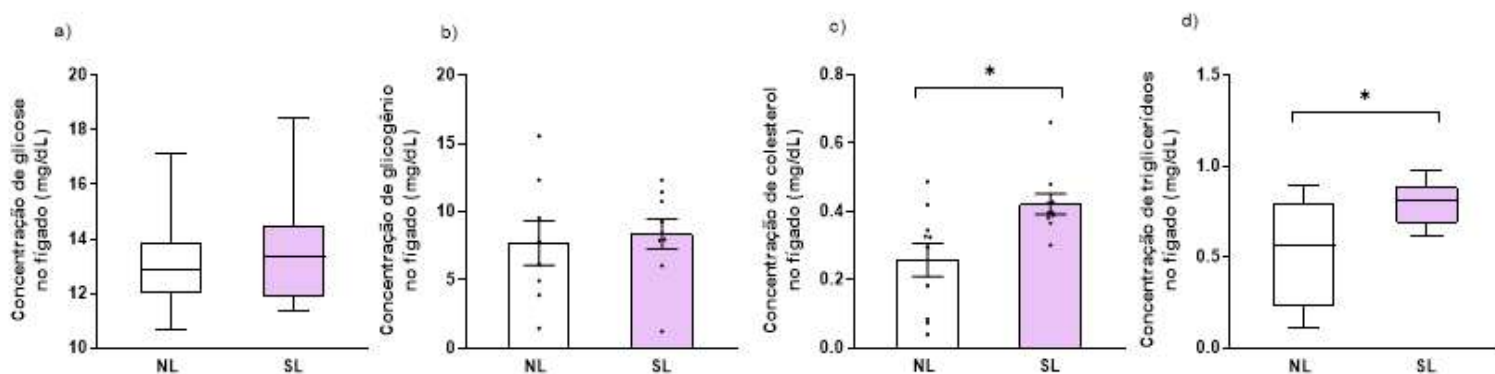
| GTT                                    | NL          | SL         | p              |
|----------------------------------------|-------------|------------|----------------|
| Basal                                  | 118,5, n=13 | 112,1, n=9 | 0,2415         |
| 15 minutos após sobrecarga de glicose  | 208,2, n=13 | 243,3, n=9 | <u>0,0456*</u> |
| 30 minutos após sobrecarga de glicose  | 171,4, n=13 | 202,1, n=9 | <u>0,0090*</u> |
| 60 minutos após sobrecarga de glicose  | 126,9, n=13 | 132,6, n=9 | 0,8568         |
| 120 minutos após sobrecarga de glicose | 119,3, n=13 | 113,8, n=9 | 0,8991         |

**Tabela 4.** Descrição estatística do perfil glicêmico dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T. P<0.05.

| Variável                   | Grupo NL           | Grupo SL           | p              | t      | df | teste   |
|----------------------------|--------------------|--------------------|----------------|--------|----|---------|
| AUC do GTT                 | 17159±409,8, n=13  | 18422±356,1, n=10  | <u>0,0404*</u> | 2,191  | 20 | Teste T |
| Glicose plasmática (mg/dL) | 112,7 ± 1,691 n=10 | 113,6 ± 2,179 n=10 | 0,7588         | 0,3118 | 18 | Teste T |
| Índice de TyG              | 4,336±0,037, n=10  | 4,332±0,047, n=10  | 0,95           | 0,0669 | 18 | Teste T |

### 5.1.4 Fígado: fontes energéticas

Não houve diferença na concentração de glicose e glicogênio no fígado entre animais NL e SL (Figura 6a, b; Tabela 5). As concentrações de colesterol e triacilgliceróis hepáticos foram maiores no grupo SL (Figura 6c, d; Tabela 5).



**Figura 6. Perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60:** Concentração de glicose (mg/dL) (a), Concentração de glicogênio (b), Concentração de colesterol no (mg/dL) (c), Concentração de triacilgliceróis(d) no fígado de ratos dos grupos NL e SL no DPN 60. (n=8-10/grupo). Teste T, dados expressos como média±EPM. Teste de Mann-Whitney, dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. P<0.05.

**Tabela 5.** Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T e mediana, 1º e 3º intervalo interquartil. para teste de Mann-Whitney. P<0.05.

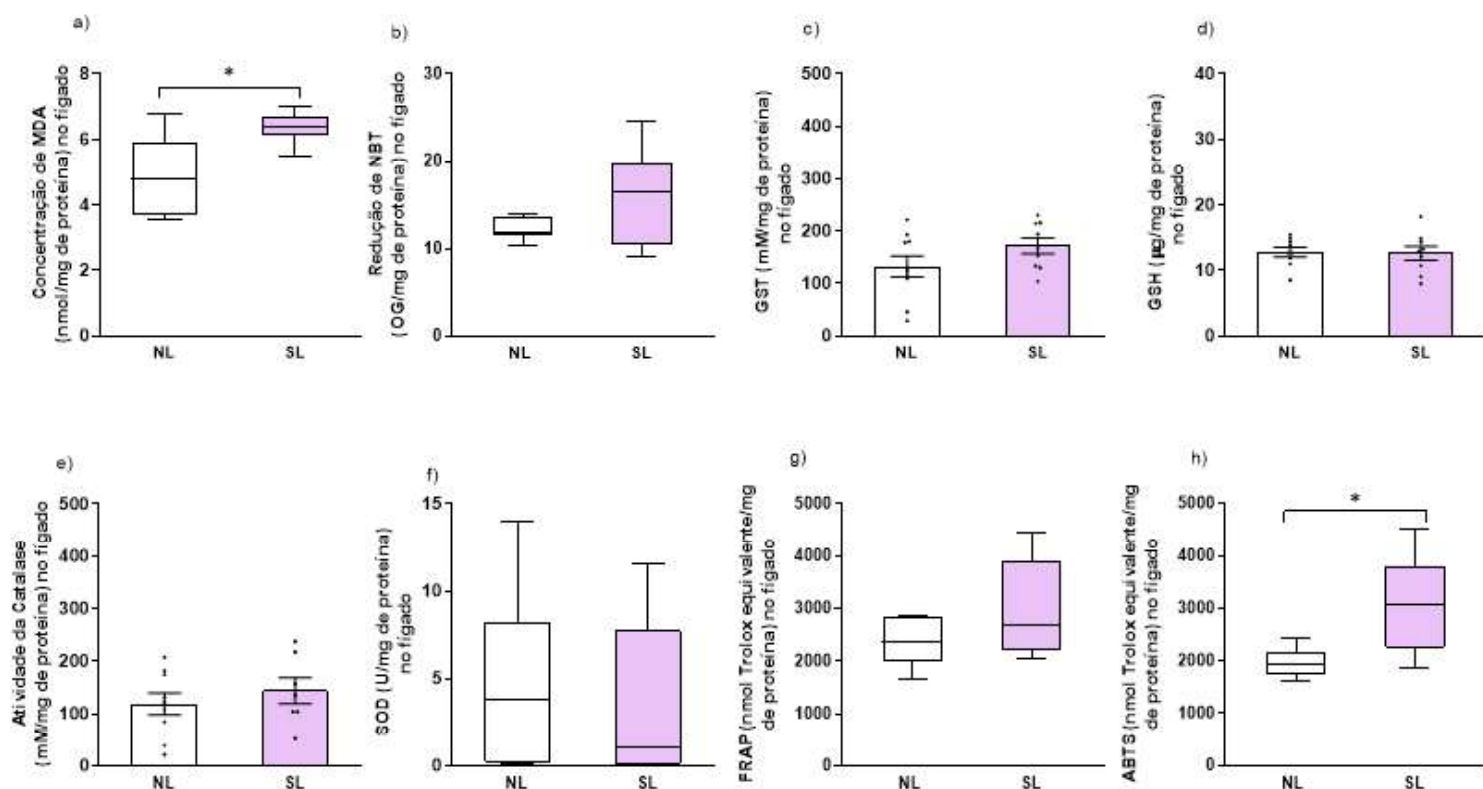
| Variável                 | Grupo NL                    | Grupo SL                     | p              | t      | df | U  | teste                 |
|--------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------|--------|----|----|-----------------------|
| Glicose (mg/dL)          | 12,83 (12,02; 13,85)<br>n=9 | 13,35 (11,91; 14,49)<br>n=10 | 0,7197         | -      | -  | 40 | Teste de Mann-Whitney |
| Glicogênio (mg/dL)       | 7,697±1,637, n=8            | 8,362±1,108, n=9             | 0,736          | 0,3435 | 15 | -  | Teste T               |
| Colesterol (mg/dL)       | 0,257±0,048, n=10           | 0,421±0,030, n=10            | <u>0,0105*</u> | 2,858  | 18 | -  | Teste T               |
| Triacilgliceróis (mg/dL) | 0,565 (0,232; 0,796), n=8   | 0,805 (0,687; 0,883) n=10    | <u>0,0434*</u> | -      | -  | 17 | Teste de Mann-Whitney |

### 5.1.5 Fígado: perfil oxidativo

As análises de parâmetros oxidativos mostraram que houve maior peroxidação lipídica no grupo SL comparado ao NL (Figura 7a; Tabela 6), porém sem diferenças significativas quanto à redução do NBT (Figura 7b; Tabela 6). Quanto às defesas antioxidantes, a concentração de GST e GSH foi semelhante em ambos os grupos (Figura 7c, d; Tabela 6). A atividade das enzimas SOD e CAT também foi semelhante nos grupos



NL e SL, assim como o FRAP (Figura 7e, f, g; Tabela 6). Porém, o ABTS foi maior no grupo SL (Figura 7h; Tabela 6).



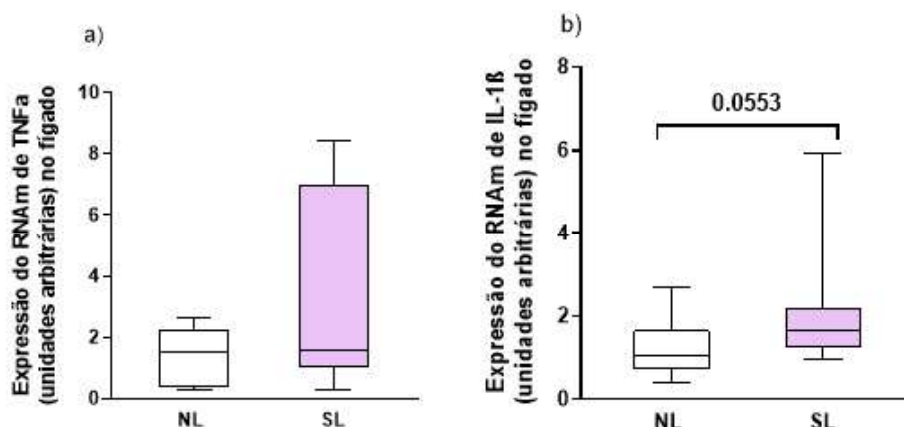
**Figura 7. Perfil oxidativo no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60:** Concentração de MDA (nmol/mg de proteína) (a), Redução de NBT (OG/mg de proteína) (b), Concentração de GST (mM/mg de proteína) (c), Concentração de GSH (mM/mg de proteína) (d), Atividade da CAT (nM/mg de proteína) (e), Atividade da SOD (U/mg de proteína) (f), FRAP (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (g), ABTS (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (h) no fígado de ratos dos grupos NL e SL no DPN 60 (n=7-10/grupo). Teste T, dados expressos como média±EPM. Teste de Mann-Whitney, dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. P<0.05.

**Tabela 6.** Descrição estatística do perfil oxidativo do fígado dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T e medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste de Mann-Whitney. P<0.05.

| Variável                                         | Grupo NL                   | Grupo SL                   | p              | t     | df | U  | teste                 |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-------|----|----|-----------------------|
| MDA (nmol/mg de proteína)                        | 4,787 (3,705; 5,908), n=9  | 6,404 (6,112; 6,686) n=9   | <u>0,0106*</u> | -     | -  | 12 | Teste de Mann Whitney |
| Redução de NBT (OG/mg de proteína)               | 11,88 (11,51; 13,65), n=9  | 16,47 (10,52; 19,79), n=10 | 0,2110         | -     | -  | 29 | Teste de Mann Whitney |
| GST (OG/mg de proteína)                          | 132,3±19,72, n=10          | 171,5±14,80, n=9           | 0,1367         | 1,562 | 17 | -  | Teste T               |
| GSH (µg/mg de proteína)                          | 12,79±0,720, n=9           | 12,60±1,043, n=9           | 0,8856         | 0,146 | 16 | -  | Teste T               |
| Atividade da CAT (mM/mg de proteína)             | 119,2±21,22, n=9           | 144,1±24,82, n=7           | 0,4552         | 0,768 | 14 | -  | Teste T               |
| Atividade da SOD (U/mg de proteína)              | 3,819 (0,195; 8,213), n=10 | 0,989 (0,091; 7,737), n=8  | 0,5726         | -     | -  | 33 | Teste de Mann Whitney |
| FRAP (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 2362 (1995; 2832), n=10    | 2700 (2221; 3890), n=10    | 0,1593         | -     | -  | 31 | Teste de Mann Whitney |
| ABTS (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 1952 (1734; 2168), n=10    | 3062 (2261; 3800), n=10    | 0,0011*        | -     | -  | 9  | Teste de Mann Whitney |

### 5.1.6 Fígado: citocinas pró-inflamatórias

Não houve diferença estatística entre os grupos NL e SL quanto às citocinas pró-inflamatórias TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , porém, houve uma tendência de aumento de IL-1 $\beta$  no grupo SL (Figura 8a, b; Tabela 7). Já o RNAm da IL-6, que também foi avaliada, não foi expressa nesse tecido.



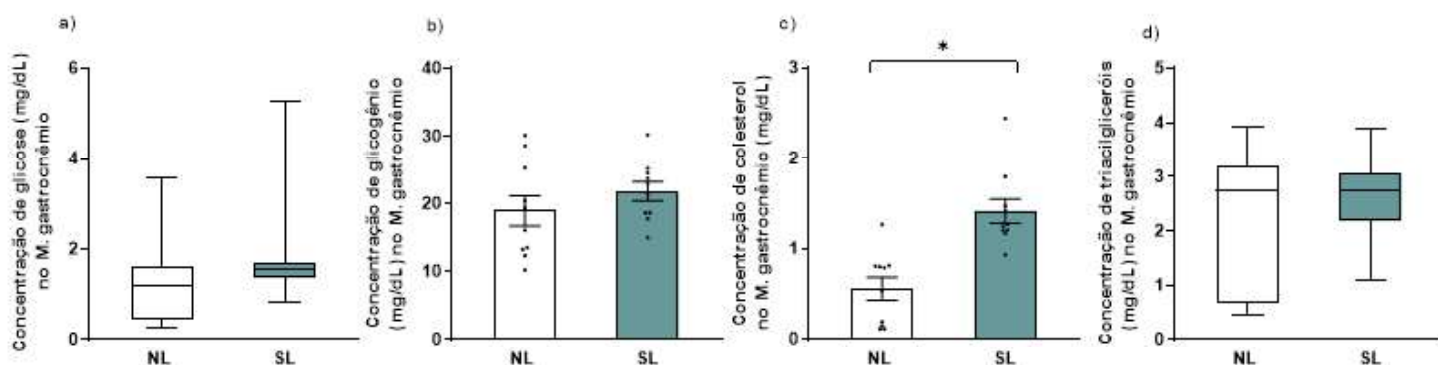
**Figura 8. Perfil inflamatório no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60:** Expressão de RNAm de TNF $\alpha$  (unidades arbitrárias) (a), Expressão de RNAm de IL-1 $\beta$  (unidades arbitrárias) (b) no fígado de ratos dos grupos NL e SL no DPN 60 (n=5-10/grupo). Teste de Mann-Whitney, dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. P<0.05.

**Tabela 7.** Descrição estatística do perfil inflamatório no fígado dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste de Mann-Whitney. P<0.05.

| Variável                            | Grupo NL                   | Grupo SL                   | p      | U  | teste                 |
|-------------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------|----|-----------------------|
| TNF $\alpha$ (unidades arbitrárias) | 1,490 (0,3790; 2,254), n=5 | 1,609 (1,015; 7,002), n=10 | 0,4396 | 18 | Teste de Mann Whitney |
| IL-1 $\beta$ (unidades arbitrárias) | 1,031 (0,718; 1,648), n=7  | 1,637 (1,243; 2,190), n=10 | 0,0553 | 15 | Teste de Mann Whitney |

#### 5.1.7 Músculo gastrocnêmio: fontes energéticas

Não houve alteração nas concentrações de glicose, glicogênio e triacilgliceróis no MG (Figura 9a, b, d; Tabela 8). Porém, as concentrações de colesterol neste músculo foram maiores no grupo SL (Figura 9c; Tabela 8).



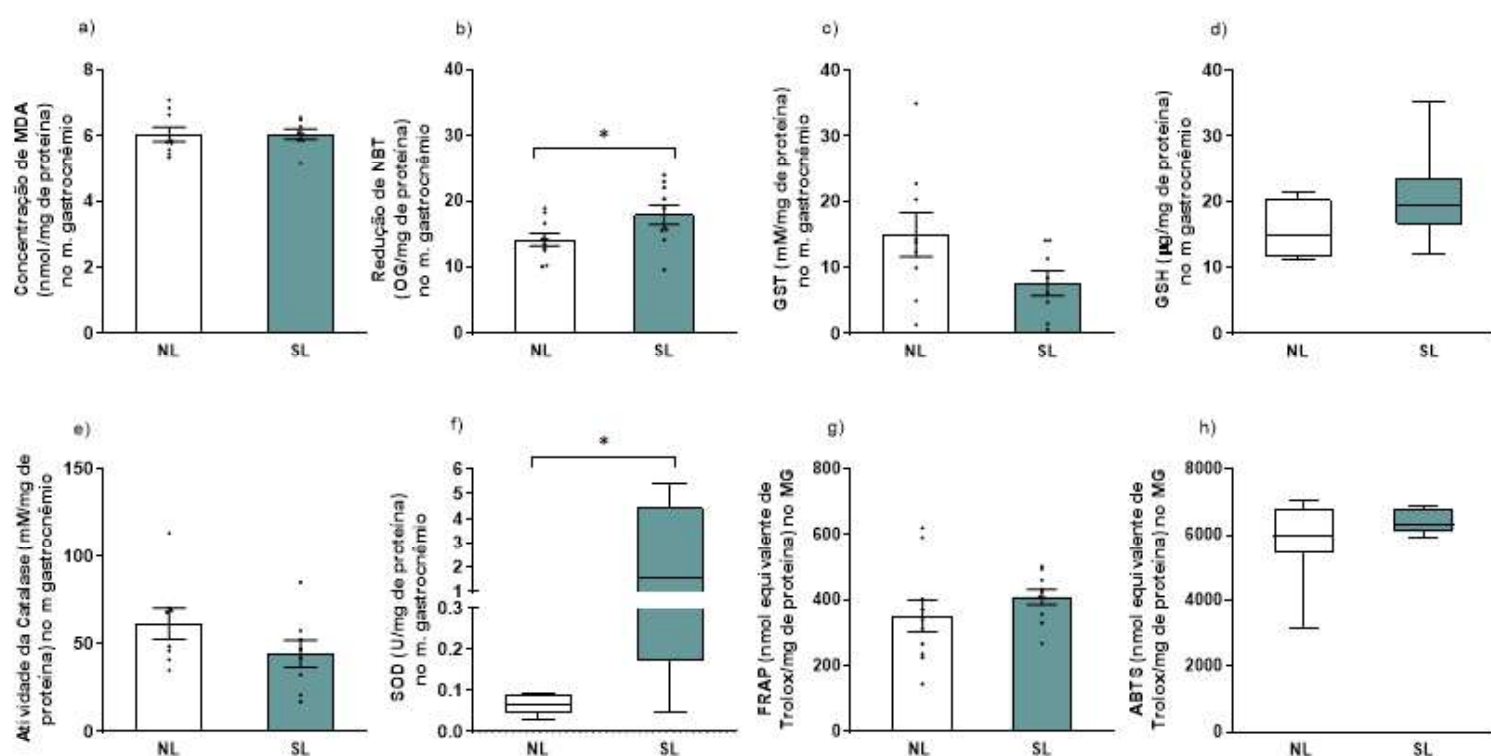
**Figura 9. Perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60:** Concentração de glicose (mg/dL) (a), Concentração de glicogênio (b), Concentração de colesterol (mg/dL) (c), Concentração de triacilgliceróis (d) no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos NL e SL no DPN 60 (n=8-10/grupo). Teste T, dados expressos como média±EPM. Teste de Mann-Whitney, dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil.  $P<0.05$ .

**Tabela 8.** Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T e medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste de Mann-Whitney.  $P<0.05$ .

| Variável                 | Grupo NL                   | Grupo SL                   | p              | t     | df | U    | teste                 |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------|-------|----|------|-----------------------|
| Glicose (mg/dL)          | 1,180 (0,445; 1,620), n=10 | 1,570 (1,375; 1,695), n=10 | 0,0991         | -     | -  | 24,5 | Teste de Mann-Whitney |
| Glicogênio (mg/dL)       | 18,96±2,237, n=10          | 21,83±1,402, n=10          | 0,2902         | 1,090 | 18 | -    | Teste T               |
| Colesterol (mg/dL)       | 0,562±0,126, n=10          | 1,417±0,135, n=10          | <u>0,0002*</u> | 4,623 | 18 | -    | Teste T               |
| Triacilgliceróis (mg/dL) | 2,746 (0,688; 3,185), n=10 | 2,736 (2,182; 3,070), n=10 | 0,9705         | -     | -  | 49   | Teste de Mann-Whitney |

#### 5.1.8 Músculo gastrocnêmio: perfil oxidativo

Não houve diferença significativa na concentração de MDA entre os grupos NL e SL, porém, no grupo SL, observou-se aumento da redução de NBT (Figura 10a, b; Tabela 9). A concentração de GST e GSH não foi diferente entre os grupos (Figura 10c, d; Tabela 9), assim como a atividade da catalase (Figura 10e; Tabela 9). A atividade da SOD foi maior no grupo SL, mas não foram observadas diferenças no FRAP e ABTS (Figura 10f, g, h; Tabela 9).



**Figura 10. Perfil oxidativo no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60:** Concentração de MDA (nmol/mg de proteína) (a), Redução de NBT (OG/mg de proteína) (b), Concentração de GST (mM/mg de proteína) (c), Concentração de GSH (mM/mg de proteína) (d), Atividade da CAT (nM/mg de proteína) (e), Atividade da SOD (U/mg de proteína) (f), FRAP (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (g), ABTS (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (h) no músculo gastrocnêmio de ratos dos grupos NL e SL no DPN 60 (n=7-10/grupo). Teste T, dados expressos como média±EPM. Teste de Mann-Whitney, dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. P<0.05.

**Tabela 9.** Descrição estatística do perfil oxidativo no músculo gastrocnêmio dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T e medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste de Mann-Whitney. P<0.05.

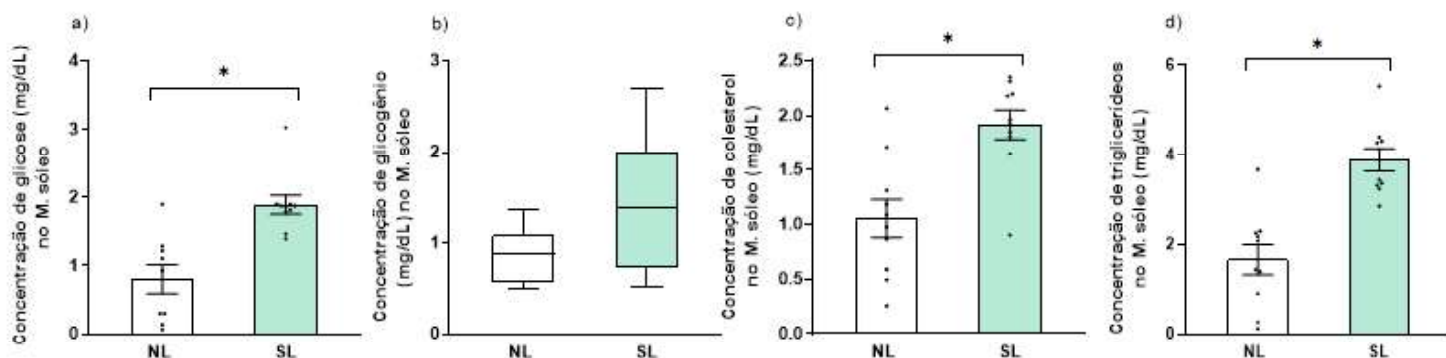
| Variável                                         | Grupo NL                  | Grupo SL                  | p              | t      | df | U  | teste                 |
|--------------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------|--------|----|----|-----------------------|
| MDA (nmol/mg de proteína)                        | 6,044±0,214, n=9          | 6,048±0,156, n=8          | 0,991          | 0,0112 | 15 | -  | Teste T               |
| Redução de NBT (OG/mg de proteína)               | 14,15±0,950, n=10         | 17,93±1,424, n=10         | <u>0,0407*</u> | 2,205  | 18 | -  | Teste T               |
| GST (OG/mg de proteína)                          | 4,95±3,341, n=9           | 7,634±1,862, n=8          | 0,0846         | 1,847  | 15 | -  | Teste T               |
| GSH (µg/mg de proteína)                          | 14,89 (11,56; 20,17), n=7 | 19,34 (16,56; 23,50), n=8 | 0,1144         | -      | -  | 14 | Teste de Mann Whitney |
| Atividade da CAT (mM/mg de proteína)             | 61,44±8,879, n=8          | 44,31±7,721, n=8          | 0,1676         | 1,455  | 14 | -  | Teste T               |
| Atividade da SOD (U/mg de proteína)              | 0,063 (0,044; 0,088), n=8 | 1,523 (0,173; 4,446), n=7 | <u>0,0093*</u> | -      | -  | 6  | Teste de Mann Whitney |
| FRAP (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 351,5±48,72, n=10         | 408,8±23,05, n=10         | 0,3011         | 1,065  | 18 | -  | Teste T               |
| ABTS (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 5974 (5454; 6787), n=10   | 6309 (6105; 6759), n=10   | 0,2799         | -      | -  | 35 | Teste de Mann Whitney |

### 5.1.9 Músculo gastrocnêmio: citocinas pró-inflamatórias

Não foi encontrada expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias investigadas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6).

### 5.1.10 Músculo sóleo: fontes energéticas

A concentração de glicose no músculo sóleo foi maior no grupo SL (Figura 11a; Tabela 10), enquanto não houve diferença na concentração de glicogênio entre os grupos (Figura 11b; Tabela 10). As concentrações do colesterol e dos triacilgliceróis também foram maiores no músculo sóleo do grupo SL (Figura 11c, d; Tabela 10).



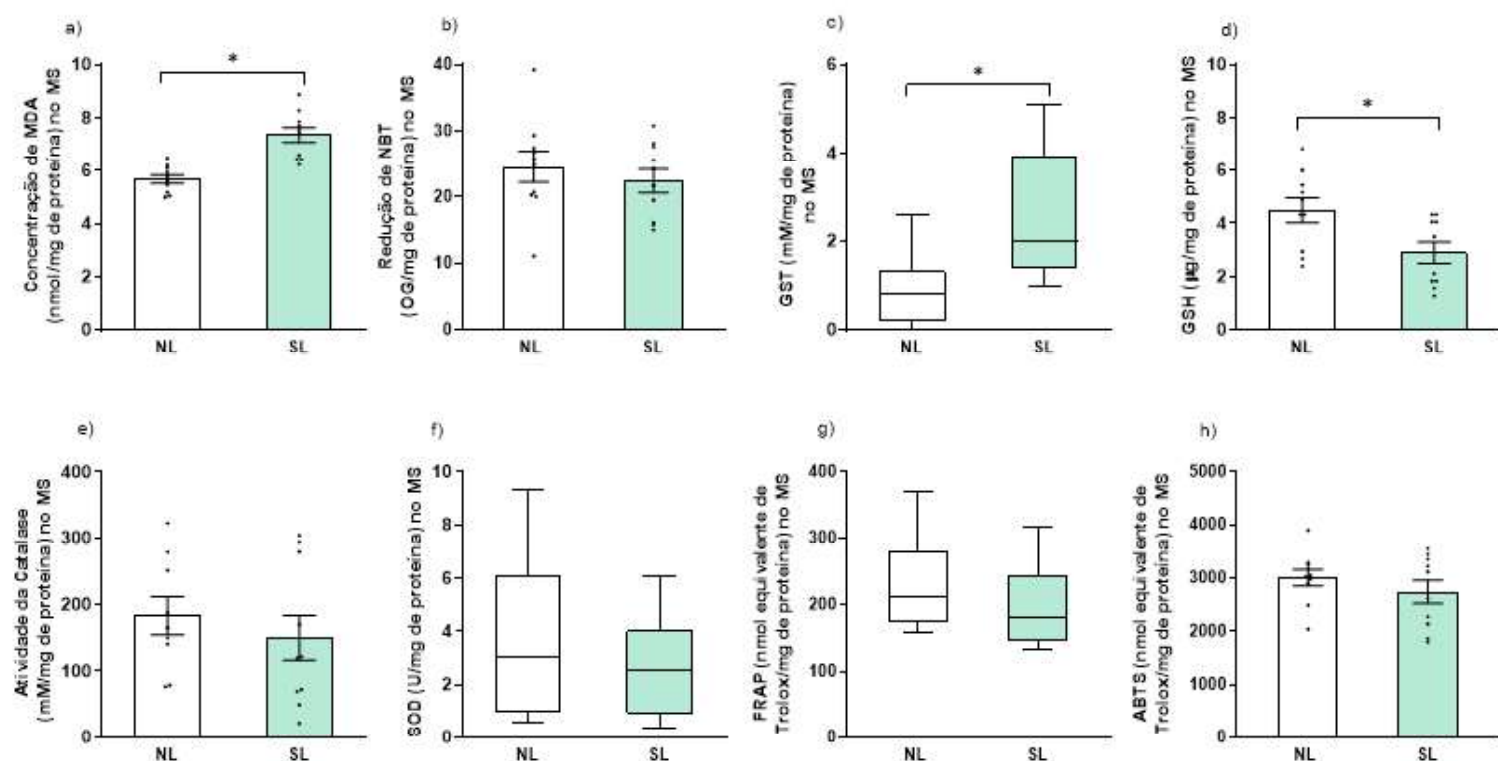
**Figura 11. Perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60:** Concentração de glicose (mg/dL) (a), Concentração de glicogênio (b), Concentração de colesterol (mg/dL) (c), Concentração de triacilgliceróis (d) no músculo sóleo de ratos dos grupos NL e SL no DPN 60 (n=8-10/grupo). Teste T, dados expressos como média±EPM. Teste de Mann-Whitney, dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. P<0.05.

**Tabela 10.** Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T e medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste de Mann-Whitney. P<0.05.

| Variável                 | Grupo NL                   | Grupo SL                   | p                  | t     | df | U    | teste                 |
|--------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|-------|----|------|-----------------------|
| Glicose (mg/dL)          | 0,8067±0,2111, n=9         | 1,894±0,1387, n=10         | <u>0,0004*</u>     | 4,390 | 17 | -    | Teste T               |
| Glicogênio (mg/dL)       | 0,876 (0,564; 1,081), n=10 | 1,393 (0,725; 1,992), n=10 | 0,1486             | -     | -  | 30,5 | Teste de Mann-Whitney |
| Colesterol (mg/dL)       | 1,056±0,175, n=10          | 1,917±0,134, n=10          | <u>0,0010*</u>     | 3,910 | 18 | -    | Teste T               |
| Triacilgliceróis (mg/dL) | 1,662±0,3383, n=10         | 3,891±0,2507, n=10         | <u>&lt;0,0001*</u> | 5,292 | 18 | -    | Teste T               |

#### 5.1.11 Músculo sóleo: perfil oxidativo

O grupo SL apresentou aumento da peroxidação lipídica no músculo sóleo (Figura 12a; Tabela 11), mas não houve diferença significativa na redução de NBT (Figura 12b; Tabela 11). A concentração de GST foi maior no grupo SL (Figura 12c; Tabela 11), enquanto a de GSH foi menor (Figura 12d; Tabela 11). Não houve diferença na atividade da catalase, SOD, FRAP e ABTS entre os grupos NL e SL (Figura 12e, f, g, h; Tabela 11).



**Figura 12. Perfil oxidativo no músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60:** Concentração de MDA (nmol/mg de proteína) (a), Redução de NBT (OG/mg de proteína) (b), Concentração de GST (mM/mg de proteína) (c), Concentração de GSH (mM/mg de proteína) (d), Atividade da CAT (mM/mg de proteína) (e), Atividade da SOD (U/mg de proteína) (f), FRAP (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (g), ABTS (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (h) no músculo sóleo de ratos dos grupos NL e SL no DPN 60 (n=7-10/grupo). Teste T, dados expressos como média±EPM. Teste de Mann-Whitney, dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. P<0.05.

**Tabela 11.** Descrição estatística do perfil oxidativo do músculo sóleo dos grupos NL e SL no DPN 60. Resultados expressos como média±EPM para teste T e medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste de Mann-Whitney. P<0.05.

| Variável                                         | Grupo NL                   | Grupo SL                   | p                  | t     | df | U     | teste                 |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|-------|----|-------|-----------------------|
| MDA (nmol/mg de proteína)                        | 5,676±0,161, n=10          | 7,353±0,283, n=10          | <u>&lt;0,0001*</u> | 5,148 | 18 | -     | Teste T               |
| Redução de NBT (OG/mg de proteína)               | 24,58±2,324, n=10          | 22,48±1,797, n=10          | 0,4837             | 0,715 | 18 | -     | Teste T               |
| GST (OG/mg de proteína)                          | 0,816 (0,193; 1,315), n=10 | 1,992 (1,382; 3,934), n=10 | <u>0,0022*</u>     | -     | -  | 11,50 | Teste de Mann Whitney |
| GSH (μg/mg de proteína)                          | 4,499±0,465, n=10          | 2,889±0,401, n=10          | <u>0,0173*</u>     | 2,622 | 18 | -     | Teste T               |
| Atividade da CAT (mM/mg de proteína)             | 183,7±28,58, n=9           | 150,3±33,75, n=10          | 0,466              | 0,745 | 17 | -     | Teste T               |
| Atividade da SOD (U/mg de proteína)              | 3,063 (0,946; 6,121), n=8  | 2,575 (0,922; 4,036), n=10 | 0,6334             | -     | -  | 34    | Teste de Mann Whitney |
| FRAP (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 213,1 (175,7; 279,4), n=10 | 182,2 (147,3; 244,4), n=10 | 0,2799             | -     | -  | 35    | Teste de Mann Whitney |



|                                                  |                  |                  |        |       |    |   |         |
|--------------------------------------------------|------------------|------------------|--------|-------|----|---|---------|
| ABTS (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 3014±155,3, n=10 | 2743±215,9, n=10 | 0,3215 | 1,020 | 18 | - | Teste T |
|--------------------------------------------------|------------------|------------------|--------|-------|----|---|---------|

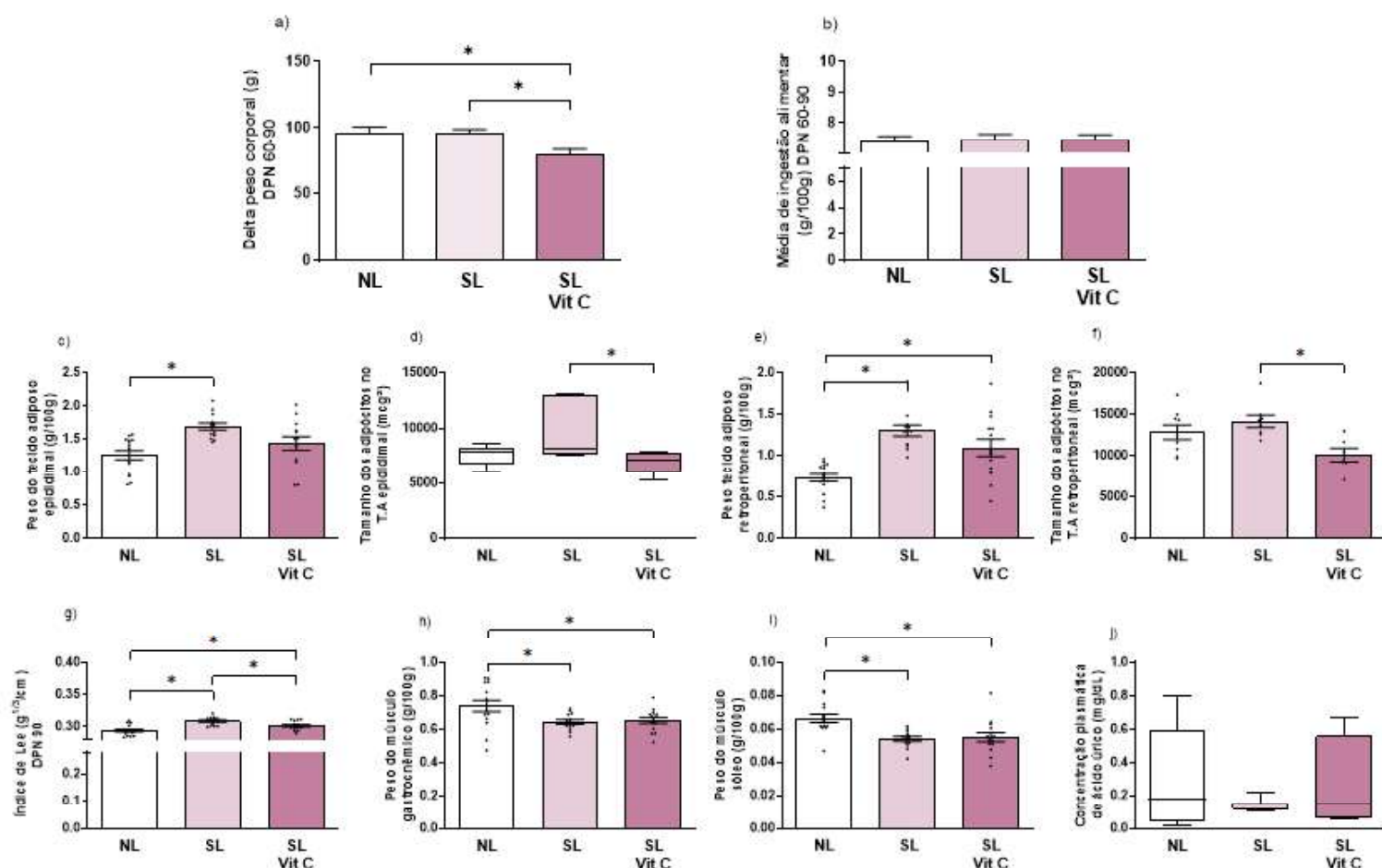
### 5.1.12 Músculo sóleo: citocinas pró-inflamatórias

Não foi encontrada expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias investigadas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6).

## 5.2 ESTUDO 2: Avaliação dos Efeitos do Tratamento com VitC na Vida Adulta (DPN 60-89) de Animais com Obesidade Induzida por Supernutrição Neonatal por Redução do Tamanho da Ninhada.

### 5.2.1 Perfil morfofisiológico

O ganho de peso durante o tratamento (60-90) do grupo SLvitC foi menor que dos grupos SLv e NLv (Figura 13a; Tabela 12), sem efeitos da VitC na ingestão alimentar (Figura 13b; Tabela 12). Embora os pesos do TA epididimal dos grupos SLv e SLvitC tenham sido semelhantes (Figura 13c; Tabela 12), houve diminuição do tamanho dos adipócitos do TAE no grupo SLvitC, comparado ao SLv (Figura 13d; Tabela 12). O peso do TAR do grupo SLvitC também foi semelhante ao SLv, e maior que o do grupo NLv (Figura 13e; Tabela 12). E tal como no TAE, o tamanho do adipócito do TAR foi menor no grupo SLvitC, comparado ao SLv (Figura 13f; Figura 15e, f; Tabela 12). O índice de Lee do grupo SLvitC, embora maior que o NLv, foi menor que o do grupo SLv (Figura 13g; Tabela 12). Os pesos dos músculos gastrocnêmio e sóleo do grupo SLvitC não diferiram do grupo SLv, sendo menores que do grupo NLv (Figura 13h, i; Tabela 12). A concentração de ácido úrico foi semelhante entre os grupos (Figura 13j; Tabela 12).



**Figura 13. Perfil morfométrico dos grupos NLv, SLv, e SLvitC no DPN 90:** Peso corporal (60-90) (a), delta peso corporal 60-90 (b), ingestão alimentar (g/100g) (c), peso do tecido adiposo epididimal (g/100g) (d), tamanho do adipócito do tecido adiposo epididimal (mcg<sup>2</sup>) (e), peso do tecido adiposo retroperitoneal (g/100g) (f), tamanho do adipócito do tecido adiposo retroperitoneal (mcg<sup>2</sup>) (g), índice de Lee (g<sup>1/3</sup>/cm) (h), peso do músculo gastrocnêmio (g/100g) (i), peso do músculo sóleo (g/100g) (j), concentração plasmática de ácido úrico (mg/dL) (k) dos grupos NLv, SLv, e SLvitC no DPN 90 (n=7-15/grupo). Dados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. P<0.05.

**Tabela 12.** Descrição estatística do perfil morfométrico dos grupos NLv, SLv, e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn. P<0.05.

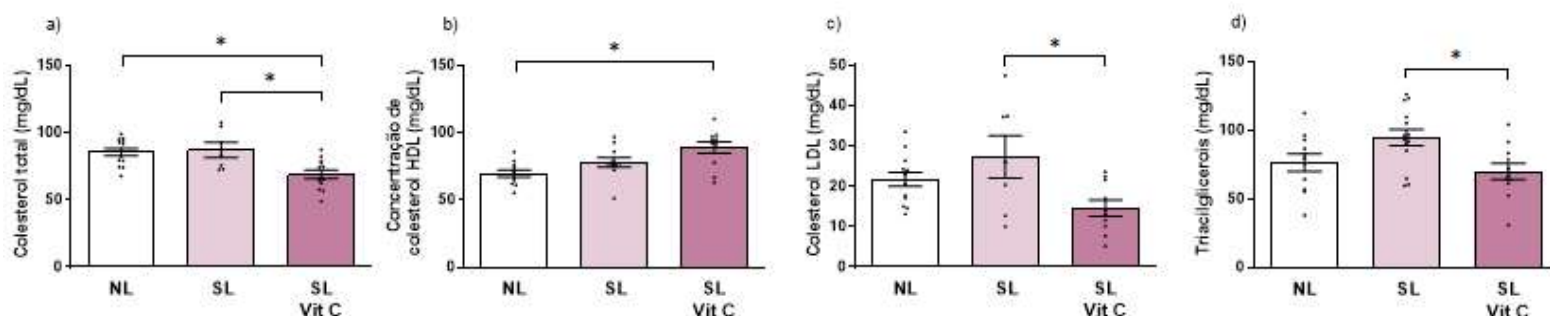
| Variável            | NL<br>veículo       | SL<br>veículo       | SL<br>vitamina<br>C | p       | teste            | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------|------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Delta peso<br>60-90 | 95,47±5,12,<br>n=15 | 95,57±3,29,<br>n=14 | 79,36±4,31,<br>n=14 | 0,0168* | One Way<br>ANOVA | Tukey's      | 0,9998                  | 0,0317*                    | 0,0339*                    |

|                                              |                           |                           |                           |                    |                |         |                    |                |                |
|----------------------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------|----------------|---------|--------------------|----------------|----------------|
| Ingestão alimentar (g/100g)                  | 7,41±0,14, n=15           | 7,47±0,15, n=14           | 7,45±0,16, n=14           | 0,9528             | One Way ANOVA  | Tukey's | 0,9522             | 0,9733         | 0,9969         |
| Peso do TAE (mg/100g)                        | 1,26±0,07, n=15           | 1,69±0,05, n=13           | 1,44±0,10, n=13           | 0,0012             | One Way ANOVA  | Tukey's | <u>0,0008*</u>     | 0,2390         | 0,0699         |
| Peso do TAR (mg/100g)                        | 0,73±0,04, n=15           | 1,31±0,07, n=12           | 1,09±0,10, n=14           | <0,0001            | One Way ANOVA  | Tukey's | <u>&lt;0,0001*</u> | <u>0,0033*</u> | 0,1556         |
| Tamanho do adipócito TAE (mcg <sup>2</sup> ) | 7805 (6707; 8255), n=9    | 8112 (7610; 13056), n=7   | 7145 (6000; 7702), n=6    | 0,0256             | Kruskal-Wallis | Dunn's  | 0,4616             | 0,4736         | <u>0,0256*</u> |
| Tamanho do adipócito TAR (mcg <sup>2</sup> ) | 12874±865, 4, n=9         | 14205±748, 4, n=8         | 10118±845,7, n=6          | 0,0129             | One Way ANOVA  | Tukey's | 0,4754             | 0,0846         | <u>0,0101*</u> |
| Índice de Lee (g <sup>1/3</sup> /cm)         | 0,29±0,002, n=15          | 0,30±0,001, n=13          | 0,301±0,001, n=14         | <u>&lt;0,0001*</u> | One Way ANOVA  | Tukey's | <u>&lt;0,0001*</u> | <u>0,0287*</u> | <u>0,0466*</u> |
| Peso MG (g/100g)                             | 0,74±0,03, n=15           | 0,64±0,01, n=13           | 0,65±0,01, n=14           | <u>0,0140*</u>     | One Way ANOVA  | Tukey's | <u>0,0243*</u>     | <u>0,0383*</u> | 0,9698         |
| Peso MS (g/100g)                             | 0,066±0,00, 2, n=14       | 0,054±0,00, 1, n=13       | 0,055±0,002, n=14         | <u>0,0009*</u>     | One Way ANOVA  | Tukey's | <u>0,0021*</u>     | <u>0,0040*</u> | 0,9519         |
| Ácido úrico plasmático (mg/dL)               | 0,178 (0,048; 0,588), n=8 | 0,122 (0,119; 0,156), n=7 | 0,145 (0,061; 0,559), n=6 | 0,9341             | Kruskal-Wallis | Dunn's  | >0,9999            | >0,9999        | >0,9999        |

### 5.2.2 Perfil lipídico

Na comparação entre os grupos NLv vs SLv, não foi observada diferença nas concentrações plasmáticas de colesterol total, das frações HDL e LDL, e triacilgliceróis (Figura 14a, b, c, d; Tabela 13).

Considerando o efeito do tratamento com VitC, a concentração plasmática de colesterol total foi menor no grupo SLvitC, comparado aos grupos NLv e SLv (Figura 14a; Tabela 13). A concentração plasmática de colesterol HDL do grupo SLvitC foi maior que a do grupo NLv (Figura 14b; Tabela 13), enquanto o grupo SLvitC apresentou redução de LDL e triacilgliceróis, comparado ao SLv (Figura 14c, d; Tabela 13).



**Figura 14. Perfil lipídico dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Concentração plasmática de colesterol total (mg/dL) (a), Concentração plasmática de colesterol HDL (mg/dL) (b), Concentração plasmática de colesterol LDL (mg/dL) (c), Concentração plasmática de triacilgliceróis (mg/dL) (d) dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90 (n=7-13/grupo). Dados expressos como média±EPM, e analisados pelo teste One Way ANOVA, com pós-teste de Tukey.  $P<0.05$ .

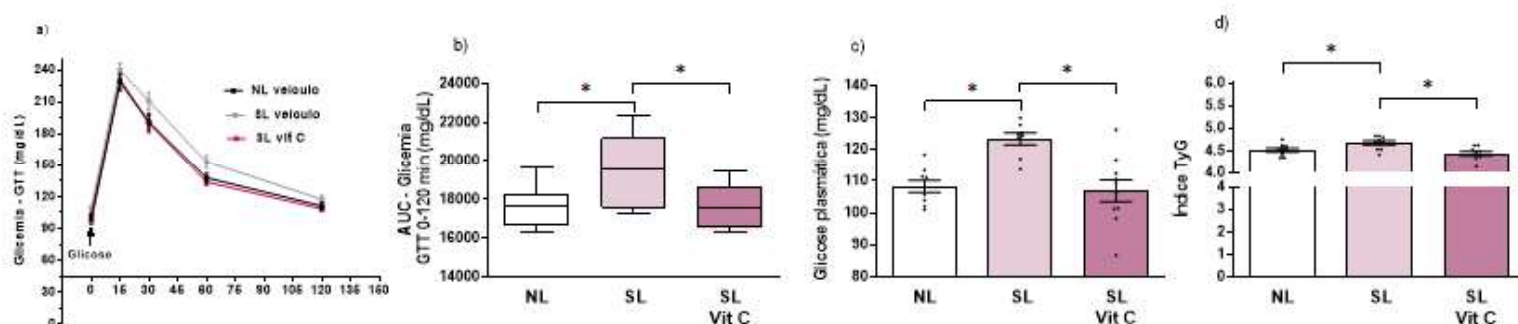
**Tabela 13.** Descrição estatística do perfil lipídico dos grupos NLv, SLv, e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey.  $P<0.05$ .

| Variável                    | NL<br>veículo       | SL<br>veículo      | SL<br>vitamina<br>C | p              | teste            | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|----------------|------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Colesterol total<br>(ug/dL) | 85,6±2,76,<br>n=13  | 87,1±5,62,<br>n=7  | 68,9±3,08,<br>n=13  | <u>0,0010*</u> | One Way<br>ANOVA | Tukey's      | 0,9594                  | <u>0,0026*</u>             | <u>0,0061*</u>             |
| Colesterol HDL<br>(ug/dL)   | 69,8±2,66,<br>n=11  | 78,1±3,56,<br>n=11 | 89,1±4,25,<br>n=11  | <u>0,0024*</u> | One Way<br>ANOVA | Tukey's      | 0,2407                  | <u>0,0017*</u>             | 0,0906                     |
| Colesterol LDL<br>(ug/dL)   | 21,8±1,700,<br>n=13 | 7,4±5,270,<br>n=7  | 14,7±2,015,<br>n=10 | <u>0,0178*</u> | One Way<br>ANOVA | Tukey's      | 0,3610                  | 0,1380                     | <u>0,0151*</u>             |
| Triacilgliceróis<br>(ug/dL) | 76,5±6,43,<br>n=11  | 94,6±5,89,<br>n=14 | 69,9±5,93,<br>n=11  | 0,0166         | One Way<br>ANOVA | Tukey's      | 0,0993                  | 0,7502                     | <u>0,0178*</u>             |

### 5.2.3 Perfil glicêmico

O grupo SLv apresentou maior área sob a curva do GTT, comparado ao grupo NLv (Figura 15b; Tabela 15). Além disso, a concentração plasmática de glicose e o índice TyG foram maiores no grupo SLv, em relação ao grupo NLv (Figura 15c, d; Tabela 15).

A AUC do GTT foi menor no grupo SLvitC, comparado ao SLv, e semelhante à AUC do GTT do grupo NLv (Figura 15b; Tabela 15). O mesmo pode ser observado quanto à glicose plasmática do grupo SLvitC, sendo menor que do grupo SLv, e semelhante à glicemia do grupo NLv (Figura 15c; Tabela 15). O perfil deste resultado se repete no cálculo do índice TyG, sendo menor no grupo SLvitC em relação ao SLv, e similar ao NLv (Figura 15d; Tabela 15).



**Figura 15. Perfil glicêmico dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Curva de glicemia no GTT (mg/dL) (a), Área sob a curva (AUC) do GTT (b), Concentração de glicose plasmática (mg/dL) (c), Índice TyG (d) dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=10-13/grupo). Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. P<0.05.

**Tabela 14.** Descrição estatística do GTT dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste Two Way ANOVA, com pós teste de Tukey. P<0.05.

| GTT                                       | NL<br>veículo  | SL<br>veículo  | SL<br>vitamina C | NLv vs.<br>SLv: p | NLv vs.<br>SLvitC: p | SLv vs.<br>SLvitC: p |
|-------------------------------------------|----------------|----------------|------------------|-------------------|----------------------|----------------------|
| Basal                                     | 100,9<br>n=15  | 108,8<br>n=15  | 96,77,<br>n=14   | 0,1455            | 0,6371               | <u>0.0080*</u>       |
| 15 minutos após<br>sobrecarga de glicose  | 228,5,<br>n=15 | 239,4,<br>n=15 | 231,1,<br>n=14   | 0,5525            | 0,9728               | 0,7127               |
| 30 minutos após<br>sobrecarga de glicose  | 191,0,<br>n=15 | 210,8,<br>n=15 | 190,2,<br>n=14   | 0,1717            | 0,9970               | 0,2302               |
| 60 minutos após<br>sobrecarga de glicose  | 137,9,<br>n=15 | 153,3,<br>n=15 | 134,1,<br>n=14   | 0,1262            | 0,7706               | <u>0.0383*</u>       |
| 120 minutos após<br>sobrecarga de glicose | 111,3,<br>n=15 | 117,5,<br>n=15 | 108,6,<br>n=14   | 0,4185            | 0,7972               | 0,1384               |

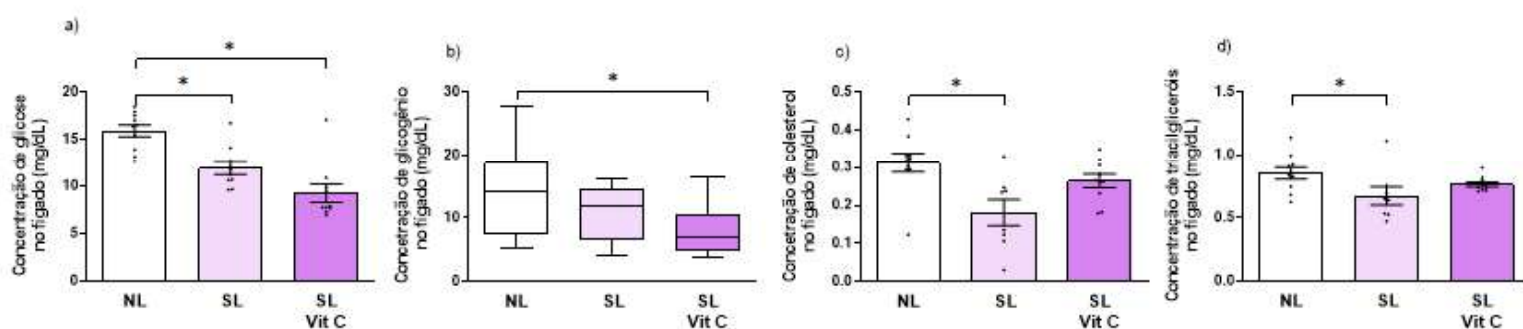
**Tabela 15.** Descrição estatística do perfil glicêmico dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn. P<0.05.

| Variável                         | NL veículo                    | SL<br>veículo                 | SL vitamina<br>C              | p              | teste              | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| AUC do<br>GTT                    | 17633 (16636;<br>18237), n=13 | 19609 (17558;<br>21190), n=10 | 17517 (16526;<br>18631), n=12 | <u>0.0126*</u> | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | <u>0.0285*</u>          | >0,9999                    | <u>0.0260*</u>             |
| Glicose<br>plasmática<br>(ug/dL) | 106,1±2,7,<br>n=10            | 117,5±4,19,<br>n=10           | 106,9±3,43,<br>n=10           | <u>0.0004*</u> | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | <u>0.0020*</u>          | 0,9219                     | <u>0.0006*</u>             |
| Índice de<br>TyG                 | 4,51±0,01,<br>n=10            | 4,67±0,04,<br>n=10            | 4,43±0,04,<br>n=10            | <u>0.0026*</u> | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | <u>0.0382*</u>          | 0,4791                     | <u>0.0022*</u>             |

### 5.2.4 Fígado: fontes energéticas

As concentrações de glicose, colesterol e triacilgliceróis foram menores no fígado do grupo SLv, em relação ao grupo NLv (Figura 16a, c, d; Tabela 16), sem diferença entre estes grupos na concentração de glicogênio hepático (Figura 16c; Tabela 16).

As concentrações de glicose e glicogênio hepáticos no grupo SLvitC foram menores que as do grupo NLv, e semelhantes às do grupo SLv (Figura 17a, b; Tabela 16). Não houve diferença na concentração de colesterol e triacilgliceróis hepáticos entre os grupos SLv e SLvitC (Figura 16c, d; Tabela 16).



**Figura 16. Perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Concentração de glicose (mg/dL) (a), Concentração de glicogênio (b), Concentração de colesterol (mg/dL) (c), Concentração de triacilgliceróis (d) no fígado de ratos dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=8-10/grupo). Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.  $P<0.05$ .

**Tabela 16.** Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no fígado dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn.  $P<0.05$ .

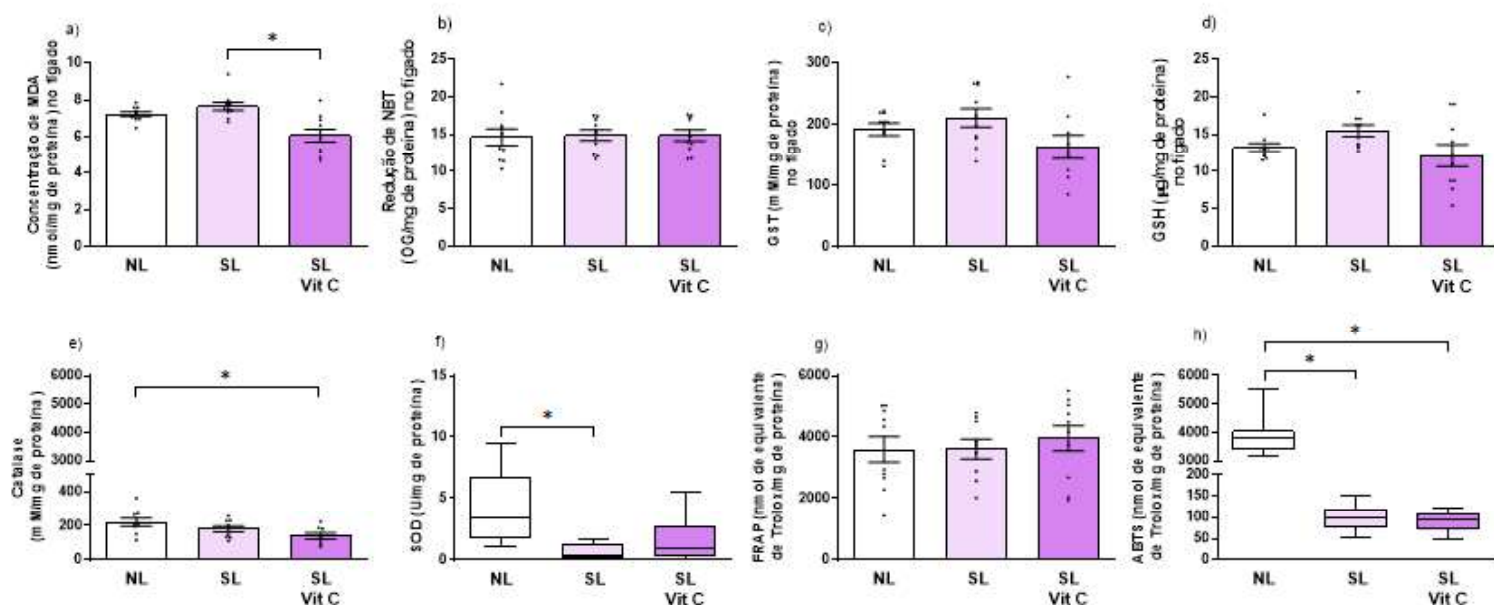
| Variável              | NL<br>veículo                | SL<br>veículo               | SL<br>vitamina C             | p                  | teste              | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|-----------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Glicose<br>(mg/dL)    | 15,91±0,643,<br>n=10         | 11,92±0,688,<br>n=10        | 9,25±0,955,<br>n=10          | <u>&lt;0,0001*</u> | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | <u>0,0032*</u>          | <u>&lt;0,0001*</u>         | 0,0549                     |
| Glicogênio<br>(mg/dL) | 14,21 (7,41;<br>18,78), n=10 | 11,89 (6,57;<br>4,80), n=10 | 7,05 (14,66;<br>10,44), n=10 | 0,0531             | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | 0,9289                  | <u>0,0475*</u>             | 0,4872                     |
| Colesterol<br>(mg/dL) | 0,313±0,024,<br>n=10         | 0,180±0,034,<br>n=8         | 0,264±0,017,<br>n=10         | <u>0,0050*</u>     | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | <u>0,0036*</u>          | 0,3501                     | 0,0766                     |

|                             |                     |                    |                     |         |                  |         |         |        |        |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|------------------|---------|---------|--------|--------|
| Triacilgliceróis<br>(mg/dL) | 0,854±0,047<br>n=10 | 0,673±0,071<br>n=8 | 0,764±0,018<br>n=10 | 0,0452* | One Way<br>ANOVA | Tukey's | 0,0358* | 0,3617 | 0,3890 |
|-----------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|---------|------------------|---------|---------|--------|--------|

### 5.2.5 Fígado: perfil oxidativo

Não foi observada diferença na concentração de MDA ou na redução de NBT entre os animais NLv e SLv (Figura 17a, b; Tabela 17). Quanto às defesas antioxidantes, no grupo SLv, a SOD e ABTS estão diminuídas, comparado ao grupo NLv (Figura 17f, h; Tabela 17). Os demais componentes do sistema antioxidante endógeno não foram diferentes entre os grupos NLv e SLv (Figura 17c, d, e, g; Tabela 17).

A concentração de MDA hepático foi menor no grupo SLvitC (Figura 17a; Tabela 17), em relação ao grupo SLv, sem diferença na redução de NBT entre os três grupos (Figura 17b; Tabela 17). A concentração de GST, GSH, SOD e FRAP não foi diferente entre os três grupos (Figura 17c, d, f, g; Tabela 17). No entanto, as concentrações de CAT e ABTS foram menores no grupo SLvitC do que NLv (Figura 17e, h; Tabela 17).



**Figura 17. Perfil oxidativo no fígado dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Concentração de MDA (nmol/mg de proteína) (a), Redução de NBT (OG/mg de proteína) (b), Concentração de GST (mM/mg de proteína) (c), Concentração de GSH (mM/mg de proteína) (d), Atividade da CAT (nM/mg de proteína) (e), Atividade da SOD (U/mg de proteína) (f), FRAP (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (g), ABTS (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (h) no fígado de ratos dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=6-10/grupo). Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. P<0.05.



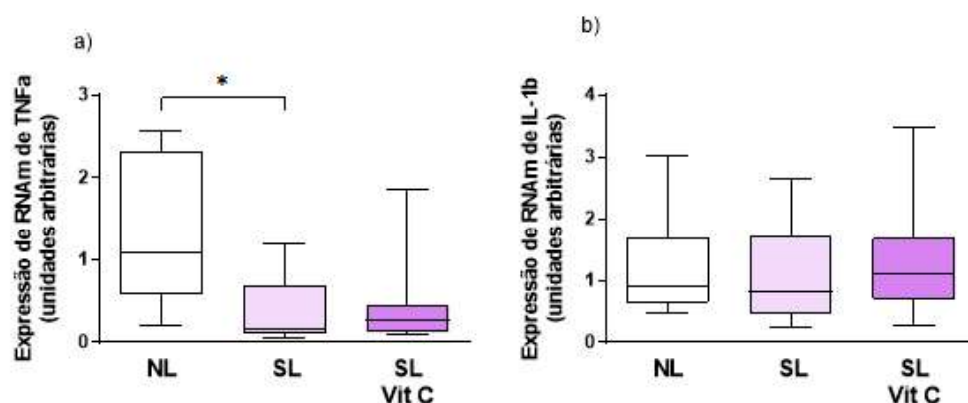
**Tabela 17.** Descrição estatística do perfil oxidativo do fígado dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil para teste Kruskal-Wallis, com pós teste de Dunn. P<0.05.

| Variável                                         | NL<br>veículo              | SL<br>veículo              | SL vitamina<br>C           | p                   | teste          | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|----------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| MDA (nmol/mg de proteína)                        | 7,240 (6,970; 7,600), n=10 | 7,500 (7,255; 7,833), n=10 | 6,030 (5,068; 6,978), n=10 | 0,0033              | Kruskal-Wallis | Dunn's       | 0,8923                  | 0,0711                     | <u>0,0029*</u>             |
| Redução de NBT (OG/mg de proteína)               | 14,63±1,10, n=10           | 14,89±0,72, n=10           | 14,88±0,74, n=10           | 0,9722              | One Way ANOVA  | Tukey's      | 0,9759                  | 0,9781                     | >0,9999                    |
| GST (OG/mg de proteína)                          | 192,3±10,20, n=10          | 211,0±14,86, n=10          | 163,6±19,22, n=9           | 0,1014              | One Way ANOVA  | Tukey's      | 0,6438                  | 0,3816                     | 0,0852                     |
| GSH (µg/mg de proteína)                          | 13,24±0,55, n=10           | 15,53±0,77, n=10           | 2,17±1,49, n=10            | 0,0781              | One Way ANOVA  | Tukey's      | 0,2732                  | 0,7397                     | 0,0700                     |
| Atividade da CAT (mM/mg de proteína)             | 222,1±24,07, n=9           | 181,2±17,53, n=9           | 140,4±18,61, n=8           | <u>0,0344*</u>      | One Way ANOVA  | Tukey's      | 0,3368                  | <u>0,0267*</u>             | 0,3587                     |
| Atividade da SOD (U/mg de proteína)              | 3,515 (1,782; 6,781), n=9  | 0,327 (0,204; 1,211), n=6  | 0,919 (0,320; 2,786), n=10 | <u>0,0043*</u>      | Kruskal-Wallis | Dunn's       | <u>0,0044*</u>          | 0,0737                     | 0,6387                     |
| FRAP (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 3597±414,4, n=10           | 3610±323,1, n=9            | 3960±415,8, n=10           | 0,7565              | One Way ANOVA  | Tukey's      | 0,9997                  | 0,7843                     | 0,8072                     |
| ABTS (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 3781 (3408; 4050), n=10    | 98,74 (74,90; 118,3), n=10 | 93,61 (71,13; 108,7), n=10 | <u>≤0,0001</u><br>* | Kruskal-Wallis | Dunn's       | <u>0,0011*</u>          | <u>0,0001*</u>             | >0,9999                    |

### 5.2.6 Fígado: citocinas pró-inflamatórias

A expressão do RNAm de TNF $\alpha$  foi menor no grupo SLv, comparado ao NLv (Figura 18a; Tabela 18), enquanto não houve diferença entre estes grupos na expressão do RNAm de IL-1 $\beta$  (Figura 18b; Tabela 18). O grupo SLvitC não apresentou diferença na expressão do RNAm de TNF $\alpha$  ou de IL-1 $\beta$  no fígado, em relação aos demais grupos (Figura 18a, b; Tabela 18). Ainda, a IL-6 não apresentou expressão alguma nesse tecido.





**Figura 18. Perfil inflamatório no fígado dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Expressão de RNAm de TNF $\alpha$  (unidades arbitrárias) (a), Expressão de RNAm de IL-1 $\beta$  (unidades arbitrárias) (b) no fígado dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=10-13/grupo). Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.  $P < 0.05$ .

**Tabela 18.** Descrição estatística do perfil inflamatório do fígado dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média $\pm$ EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.  $P < 0.05$ .

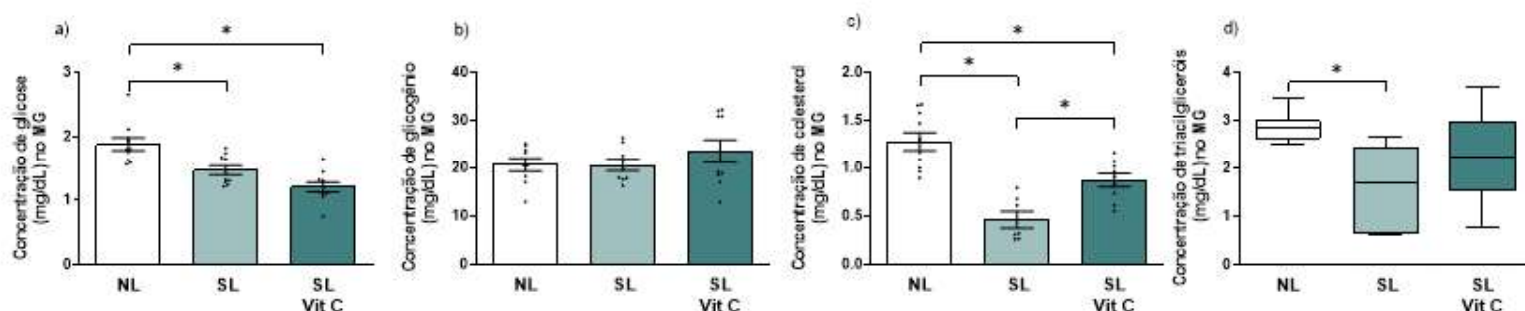
| Variável     | NL<br>veículo                 | SL<br>veículo                 | SL<br>vitamina C              | p              | teste              | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|--------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|----------------|--------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| TNF $\alpha$ | 1,088 (0,574;<br>2,319), n=7  | 0,152 (0,109;<br>0,694), n=9  | 0,267 (0,125;<br>0,446), n=10 | <u>0,0243*</u> | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | <u>0,0240*</u>          | 0,1232                     | >0,9999                    |
| IL-1 $\beta$ | 0,890 (0,648;<br>1,694), n=10 | 0,810 (0,473;<br>1,709), n=10 | 1,093 (0,696;<br>1,680), n=10 | 0,6620         | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | >0,9999                 | >0,9999                    | >0,9999                    |

### 5.2.7 Músculo gastrocnêmio: fontes energéticas

As concentrações de glicose, colesterol e triacilgliceróis no músculo gastrocnêmio foram menores no grupo SLv, comparado ao NLv (Figura 19a, c, d; Tabela 19), e não foi observada diferença entre estes dois grupos na concentração de glicogênio no músculo (Figura 19b; Tabela 19).

A concentração de glicose no músculo gastrocnêmio foi menor no grupo SLvitC, comparado ao NLv, sem diferenças entre os grupos SLv e SLvitC (Figura 19a; Tabela 19). A concentração de colesterol no músculo gastrocnêmio do grupo SLvitC foi menor que a do grupo NLv, porém maior que a do SLv (Figura 19c; Tabela 19). Não houve diferença

nas concentrações de glicogênio e triacilgliceróis neste músculo no grupo SLvitC em relação aos demais grupos (Figura 19b, d; Tabela 19).



**Figura 19. Perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Concentração de glicose (mg/dL) (a), Concentração de glicogênio (b), Concentração de colesterol (mg/dL) (c), Concentração de triacilgliceróis (d) no músculo gastrocnêmio de ratos de NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=7-10/grupo). Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós-teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.  $P < 0.05$ .

**Tabela 19.** Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.  $P < 0.05$ .

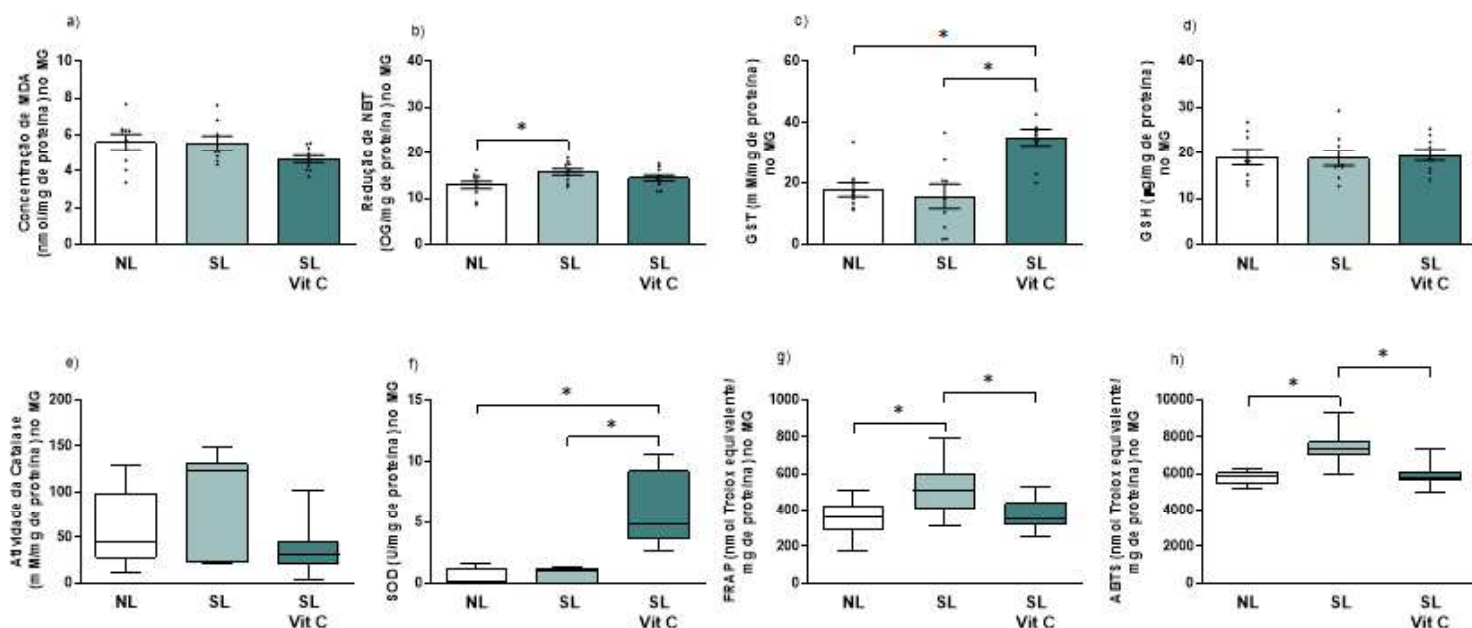
| Variável                    | NL<br>veículo                 | SL<br>veículo                | SL<br>vitamina C             | p           | teste              | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|-----------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------|--------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Glicose<br>(mg/dL)          | 1,884±0,102,<br>n=10          | 1,473±0,071,<br>n=10         | 1,210±0,077,<br>n=10         | $<0,0001^*$ | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | $0,0054^*$              | $<0,0001^*$                | 0,0908                     |
| Glicogênio<br>(mg/dL)       | 20,74±4,053,<br>n=9           | 20,64±3,605,<br>n=9          | 23,63±7,273,<br>n=10         | 0,3914      | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | 0,9991                  | 0,4773                     | 0,4539                     |
| Colesterol<br>(mg/dL)       | 1,281±0,094,<br>n=10          | 0,464±0,084,<br>n=7          | 0,874±0,069,<br>n=9          | $<0,0001^*$ | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | $<0,0001^*$             | $0,0049^*$                 | $0,0095^*$                 |
| Triacilgliceróis<br>(mg/dL) | 2,860 (2,627;<br>3,002), n=10 | 1,706 (0,650;<br>2,443), n=9 | 2,252 (1,537;<br>2,986), n=8 | $0,0045^*$  | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | $0,0031^*$              | 0,2579                     | 0,4627                     |

### 5.2.8 Músculo gastrocnêmio: perfil oxidativo

Embora a concentração de MDA no músculo gastrocnêmio não tenha apresentado diferenças significativas entre os grupos NLv e SLv (Figura 20a; Tabela 20), foi observada maior concentração de NBT no grupo SLv, em relação ao NLv (Figura 20b; Tabela 20). Não houve diferença entre os animais NLv e SLv nas defesas antioxidantes endógenas

GST, GSH, CAT e SOD (Figura 20c, d, e, f; Tabela 20), mas FRAP e ABTS foram maiores no grupo SLv, comparado ao NLv (Figura 20g, h; Tabela 20).

Não houve efeito do tratamento com VitC na concentração de MDA e NBT, comparado aos demais grupos (Figura 20a, b; Tabela 20). A concentração de GST e a atividade da SOD foram maiores no grupo SLvitC, comparado aos grupos NLv e SLv (Figura 20c, f; Tabela 20). O FRAP e o ABTS foram menores no grupo SLvitC, comparados ao SLv (Figura 20g, h; Tabela 20). Não houve alteração nas defesas antioxidantes GSH e CAT entre os grupos (Figura 20d, e; Tabela 20).



**Figura 20. Perfil oxidativo no músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Concentração de MDA (nmol/mg de proteína) (a), Redução de NBT (OG/mg de proteína) (b), Concentração de GST (mM/mg de proteína) (c), Concentração de GSH (mM/mg de proteína) (d), Atividade da CAT (nM/mg de proteína) (e), Atividade da SOD (U/mg de proteína) (f), FRAP (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (g), ABTS (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (h) no músculo gastrocnêmio de grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=5-10/grupo). Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. P<0.05.

**Tabela 20.** Descrição estatística do perfil oxidativo do músculo gastrocnêmio dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. P<0.05.

| Variável                                         | NL<br>veículo                    | SL<br>veículo                    | SL vitamina<br>C                 | p              | teste              | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|--------------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------|--------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| MDA (nmol/mg de proteína)                        | 5,588±0,449,<br>n=10             | 5,527±0,414,<br>n=8              | 4,653±0,204,<br>n=10             | 0,1299         | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | 0,9926                  | 0,1648                     | 0,2234                     |
| Redução de NBT (OG/mg de proteína)               | 12,90±0,799,<br>n=10             | 15,81±0,676,<br>n=10             | 14,45±0,658,<br>n=10             | <u>0,0269*</u> | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | <u>0,0205*</u>          | 0,2916                     | 0,3842                     |
| GST (OG/mg de proteína)                          | 17,78±2,304,<br>n=9              | 15,60±4,001,<br>n=9              | 35,07±2,765,<br>n=10             | <u>0,0002*</u> | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | 0,8772                  | <u>0,0014*</u>             | <u>0,0004*</u>             |
| GSH (µg/mg de proteína)                          | 19,02±1,658,<br>n=9              | 18,83±1,689,<br>n=9              | 9,59±1,166,<br>n=10              | 0,9323         | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | 0,9956                  | 0,9616                     | 0,9319                     |
| Atividade da CAT (mM/mg de proteína)             | 45,25 (27,25;<br>98,38),<br>n=8  | 123,5(22,00;<br>131,5),<br>n=7   | 31,00 (20,50;<br>44,50),<br>n=9  | 0,1584         | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | >0,9999                 | 0,9079                     | 0,1680                     |
| Atividade da SOD (U/mg de proteína)              | 0,030 (0,026;<br>1,198),<br>n=7  | 1,008(0,008;<br>1,241),<br>n=5   | 4,817 (3,621;<br>9,250),<br>n=5  | <u>0,0017*</u> | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | >0,9999                 | <u>0,0151*</u>             | <u>0,0175*</u>             |
| FRAP (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 365,9 (293,3;<br>424,5),<br>n=10 | 509,8<br>(412,8;<br>597,9), n=10 | 356,7 (319,3;<br>443,0),<br>n=10 | <u>0,0129*</u> | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | <u>0,0287*</u>          | >0,9999                    | <u>0,0357*</u>             |
| ABTS (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 5886 (5423;<br>6107), n=10       | 7378 (7035;<br>7765), n=10       | 5826 (5657;<br>6106), n=10       | <u>0,0004*</u> | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | <u>0,0020*</u>          | >0,9999                    | <u>0,0017*</u>             |

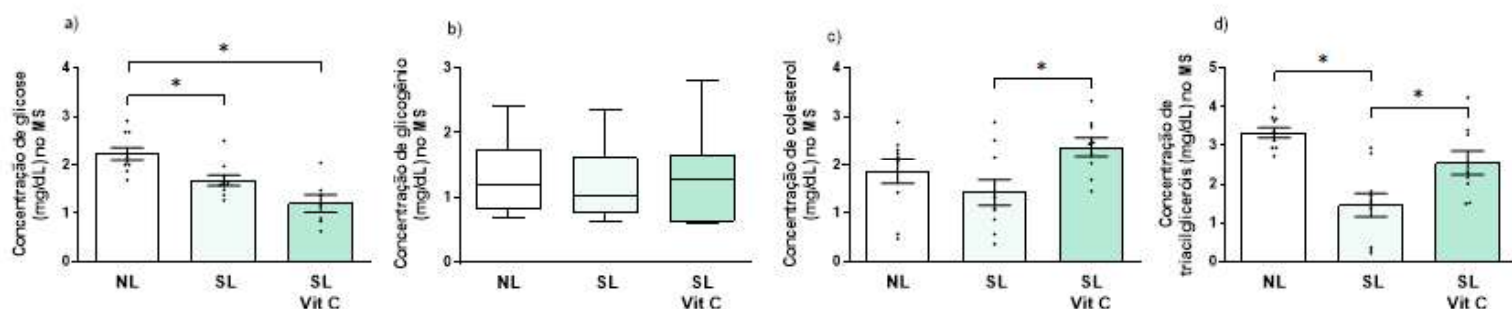
### 5.2.9 Músculo gastrocnêmio: citocinas pró-inflamatórias

Não foi encontrada expressão de RNAm das citocinas pró-inflamatórias investigadas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6).

### 5.2.10 Músculo sóleo: fontes energéticas

Comparadas ao grupo NLv, as concentrações de glicose e triacilgliceróis foram menores no grupo SLv (Figura 21a, d; Tabela 21). Já as concentrações de glicogênio e colesterol foram semelhantes entre esses dois grupos (Figura 21b, c; Tabela 21).

A concentração de glicose no músculo sóleo foi menor no grupo SLvitC, comparada à do grupo NLv (Figura 21a; Tabela 21). Não houve diferença na concentração de glicogênio entre os grupos avaliados (Figura 21b; Tabela 21). As concentrações de colesterol e triacilgliceróis foram maiores no grupo SLvitC comparado ao SLv (Figura 21c, d; Tabela 21).



**Figura 21. Perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Concentração de glicose (mg/dL) (a), Concentração de glicogênio (b), Concentração de colesterol (mg/dL) (c), Concentração de triacilgliceróis (d) no músculo sóleo de grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=7-10/grupo). Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.  $P < 0.05$ .

**Tabela 21.** Descrição estatística do perfil de fontes energéticas no músculo sóleo dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.  $P < 0.05$ .

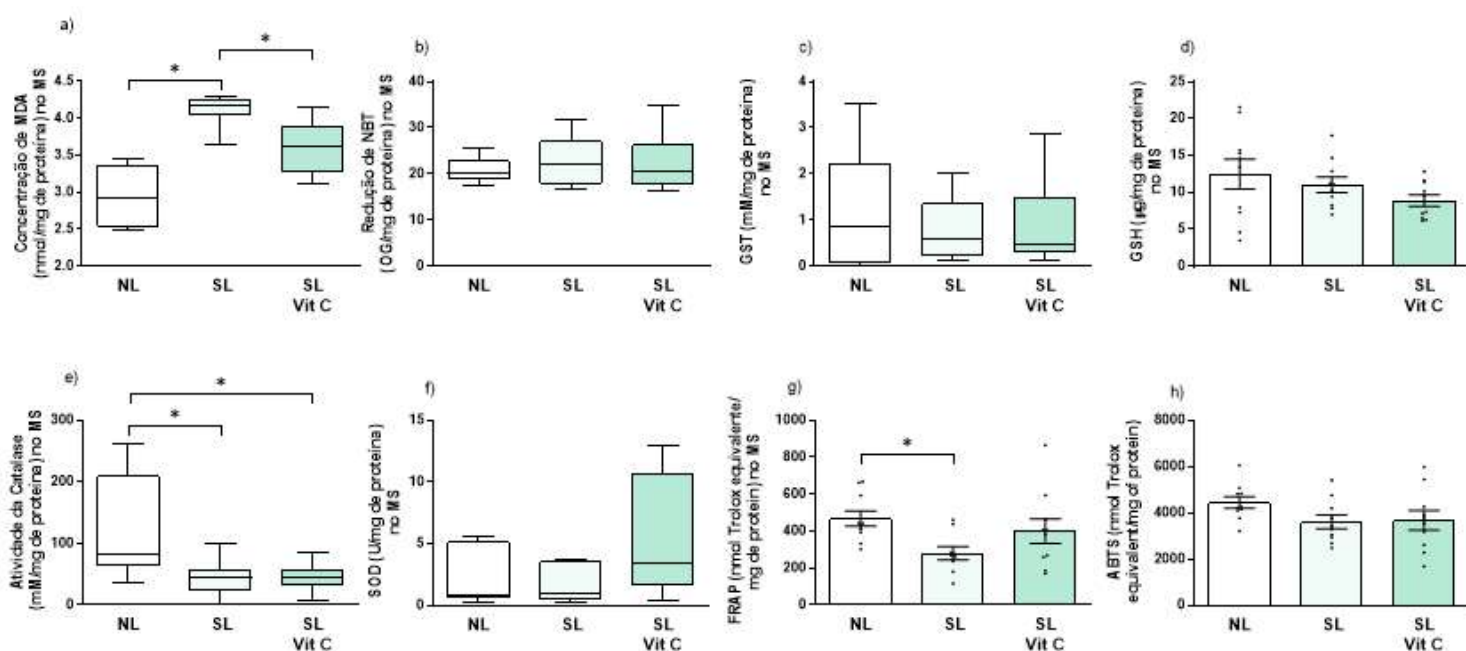
| Variável                    | NL<br>veículo                 | SL<br>veículo                 | SL<br>vitamina C              | p                  | teste              | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Glicose<br>(mg/dL)          | 2,232±0,125,<br>n=10          | 1,679±0,109,<br>n=10          | 1,201±0,180,<br>n=7           | <u>&lt;0,0001*</u> | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | <u>0,0138*</u>          | <u>&lt;0,0001*</u>         | 0,0597                     |
| Glicogênio<br>(mg/dL)       | 1,191 (0,813;<br>1,734), n=10 | 1,030 (0,747;<br>1,619), n=10 | 1,274 (0,630;<br>1,653), n=10 | 0,8755             | Kruskal-<br>Wallis | Dunn's       | >0,9999                 | >0,9999                    | >0,9999                    |
| Colesterol<br>(mg/dL)       | 1,867±0,250,<br>n=10          | 1,550±0,262,<br>n=9           | 2,367±0,195,<br>n=9           | <u>0,0390*</u>     | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | 0,4082                  | 0,3309                     | <u>0,0302*</u>             |
| Triacilgliceróis<br>(mg/dL) | 3,335±0,130,<br>n=10          | 1,463±0,302,<br>n=10          | 2,555±0,306,<br>n=9           | <u>&lt;0,0001*</u> | One Way<br>ANOVA   | Tukey's      | <u>&lt;0,0001*</u>      | 0,1037                     | <u>0,0165*</u>             |

### 5.2.11 Músculo sóleo: perfil oxidativo

Houve aumento na concentração de MDA no músculo sóleo do grupo SLv, em relação ao NLv (Figura 22a; Tabela 22), sem diferença na concentração de NBT entre

estes dois grupos (Figura 22b; Tabela 22). A atividade da catalase e o FRAP foram menores no grupo SLv, em relação ao grupo NLv (Figura 22e, g; Tabela 22). Não foi observada diferença nas concentrações de GST, GSH, atividade da SOD e ABTS entre os animais NLv e SLv (Figura 22c, d, f, h; Tabela 22).

A concentração de MDA no músculo sóleo foi menor no grupo SLvitC comparado ao SLv (Figura 22a), porém não houve alteração no NBT entre os grupos avaliados (Figura 22b). Quanto às defesas antioxidantes endógenas no músculo sóleo, não houve efeito da VitC nas concentrações de GST, GSH, SOD, FRAP (Figura 22c, d, f, g, h). Já a atividade da catalase foi menor no grupo SLvitC, comparado ao NLv (Figura 22e).



**Figura 22. Perfil oxidativo no músculo sóleo dos grupos NLv, SLv, NLv e SLvitC no DPN 90:** Concentração de MDA (nmol/mg de proteína) (a), Redução de NBT (OG/mg de proteína) (b), Concentração de GST (mM/mg de proteína) (c), Concentração de GSH (mM/mg de proteína) (d), Atividade da CAT (nM/mg de proteína) (e), Atividade da SOD (U/mg de proteína) (f), FRAP (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (g), ABTS (nmol de equivalente de Trolox/mg de proteína) (h) no músculo sóleo de grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90 (n=7-10/grupo). Resultados expressos como média ± EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Dados expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn. P < 0.05.

**Tabela 22.** Descrição dos resultados do perfil oxidativo do músculo sóleo dos grupos NLv, SLv e SLvitC no DPN 90. Resultados expressos como média±EPM para teste One Way ANOVA, com pós teste de Tukey. Expressos como medianas, 1º e 3º intervalo interquartil e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, com pós-teste de Dunn.

| Variável                                         | NL<br>veículo              | SL<br>veículo              | SL<br>vitamina C           | p                  | teste          | pós<br>teste | NLv<br>vs.<br>SLv:<br>p | NLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p | SLv<br>vs.<br>SLvitC:<br>p |
|--------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------|----------------|--------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| MDA (nmol/mg de proteína)                        | 2,913 (2,538; 3,368), n=8  | 4,172 (4,036; 4,257), n=10 | 3,624 (3,278; 3,900), n=10 | <u>&lt;0,0001*</u> | Kruskal-Wallis | Dunn's       | <u>&lt;0,0001*</u>      | 0,1410                     | <u>0,0433*</u>             |
| Redução de NBT (OG/mg de proteína)               | 20,19 (18,91; 22,89), n=10 | 22,14 (17,87; 27,11), n=10 | 20,70 (17,68; 26,29), n=10 | 0,8010             | Kruskal-Wallis | Dunn's       | >0,9999                 | >0,9999                    | >0,9999                    |
| GST (OG/mg de proteína)                          | 0,874 (0,067; 2,235), n=10 | 0,573 (0,221; 1,351), n=10 | 0,477 (0,298; 1,485), n=10 | 0,9834             | Kruskal-Wallis | Dunn's       | >0,9999                 | >0,9999                    | >0,9999                    |
| GSH (µg/mg de proteína)                          | 12,49±2,019, n=10          | 11,03±1,048, n=10          | 8,906±0,792, n=10          | 0,2049             | One Way ANOVA  | Tukey's      | 0,7404                  | 0,1810                     | 0,5339                     |
| Atividade da CAT (mM/mg de proteína)             | 82,00 (64,00; 209,8), n=9  | 45,00 (23,00; 57,75), n=9  | 44,00 (31,38; 57,63), n=10 | <u>0,0159*</u>     | Kruskal-Wallis | Dunn's       | <u>0,0395*</u>          | <u>0,0345*</u>             | >0,9999                    |
| Atividade da SOD (U/mg de proteína)              | 0,840 (0,560; 5,160), n=7  | 1,022 (0,424; 3,537), n=6  | 3,392 (1,657; 10,73), n=8  | 0,1465             | Kruskal-Wallis | Dunn's       | >0,9999                 | 0,3098                     | 0,2654                     |
| FRAP (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 466,8±40,96, n=10          | 280,4±36,64, n=9           | 400,0±66,14, n=10          | <u>0,0489*</u>     | One Way ANOVA  | Tukey's      | <u>0,0404*</u>          | 0,6136                     | 0,2404                     |
| ABTS (nmol equivalente de Trolox/mg de proteína) | 4446±248,2, n=10           | 3598±296,7, n=10           | 667±423,7, n=10            | 0,1517             | One Way ANOVA  | Tukey's      | 0,1849                  | 0,2374                     | 0,9880                     |

### 5.2.12 Músculo sóleo: citocinas pró-inflamatórias

Não foi encontrada expressão de RNAm de nenhuma das citocinas pró-inflamatórias investigadas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6).

## 6. DISCUSSÃO

Os principais achados deste trabalho foram:

- Os animais com obesidade induzida por supernutrição lactacional (SL), no DPN 60, apresentaram maior peso corporal e adiposidade, com hipertrofia adipocitária, mesmo

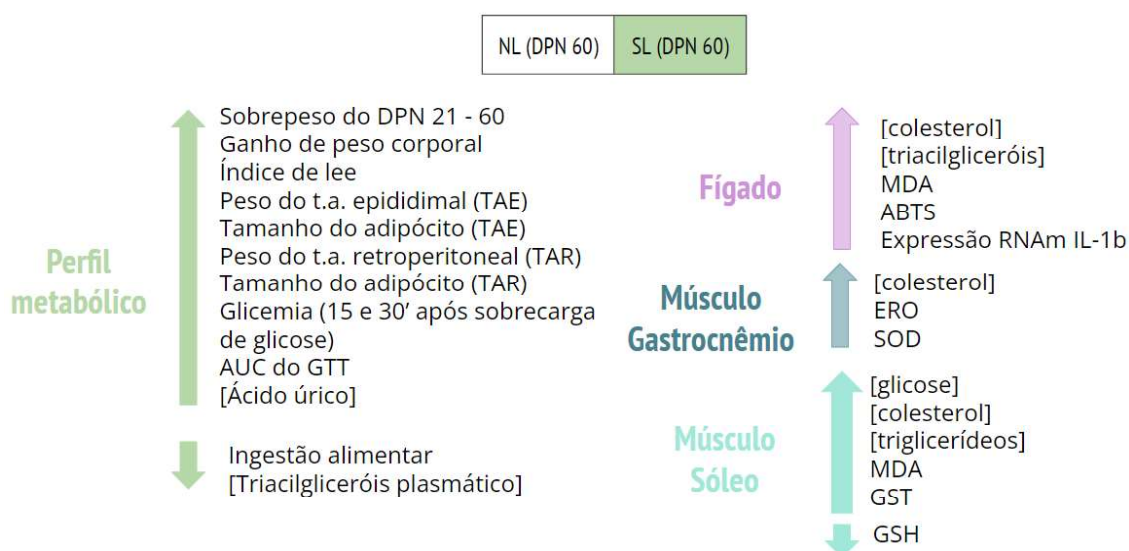


com redução da ingestão alimentar, e intolerância à glicose. O fígado apresentou dano oxidativo e aumento de citocina pró-inflamatória. O MS também apresentou peroxidação lipídica e houve aumento de ERO no MG. Nos hepatócitos e miócitos, houve maior deposição lipídica, enquanto a concentração plasmática de triacilgliceróis foi diminuída, e a de ácido úrico apresentou tendência de aumento.

- No DPN 90, o grupo SLv manteve maior peso corporal e adiposidade, e apresentou redução de massa muscular esquelética. Houve glicemia basal aumentada, resistência à insulina e intolerância à glicose. No fígado houve redução de atividade antioxidante (desequilíbrio redox). No MG, houve aumento de ERO, e no MS, houve dano oxidativo (peroxidação lipídica). Nos hepatócitos e miócitos (MG), houve redução da concentração de glicose e lipídios. Nos miócitos de MS houve menor concentração de glicose.

- No DPN 90, após 30 dias de tratamento com Vitamina C, esse antioxidante foi capaz de reduzir peso corporal, tamanho dos adipócitos, lipídios plasmáticos, resistência à insulina e intolerância à glicose. Reduziu a peroxidação lipídica no fígado e MS, aumentou a concentração de lipídios no MG e MS.

**Figura 23.** Resumo dos resultados estatisticamente significativos do Estudo 1 (NL e SL no DPN 60).



Como pode ser observado na Figura 23, no Estudo 1, o aumento do peso corporal do grupo com obesidade induzida pela supernutrição no período lactacional, observado desde a infância até o início da vida adulta (DPN 60), está de acordo com dados prévios da literatura (Conceição et al., 2013; Wunderlich et al., 2023a,b). Além disso, o maior peso corporal deste grupo esteve associado ao aumento do peso do tecido adiposo branco (TAE e TAR), que por sua vez, relaciona-se à hipertrofia adipocitária, como evidenciado anteriormente (Conceição et al., 2013; Hou et al., 2011). A menor ingestão alimentar



observada nos animais SL pode estar relacionada à uma possível alteração no controle neuroendócrino da ingestão alimentar, influenciados por redes neurais no sistema nervoso central (Reddon et al., 2018), que visa a uma inibição tônica de consumo de energia, na tentativa fisiológica de aumentar seu gasto de energia e diminuir os mecanismos relacionados à fome, controlando assim o peso corporal (Lazzer et al., 2004; Hopkins et al., 2023). No entanto, a menor ingestão alimentar no grupo SL não foi capaz de reduzir seu peso corporal.

Adicionalmente, é possível que tenha ocorrido uma redução do gasto energético, uma vez que a proporção entre tecido adiposo e massa muscular esquelética estão relacionadas à taxa metabólica basal (Melo et al., 2008). Embora não tenha sido observada perda de massa muscular esquelética no grupo SL no DPN 60, o excesso de tecido adiposo pode reduzir o gasto energético e ser uma explicação para maior adiposidade nos animais adultos com supernutrição lactacional, apesar de sua menor ingestão alimentar (Huang et al., 2004; Melo et al., 2008). Vale ressaltar que a atividade locomotora não foi avaliada no presente trabalho, mas estudos anteriores demonstraram que dietas obesogênicas durante a fase de lactação podem promover diminuição da locomoção, reduzindo o gasto energético diário (Warneke et al., 2014; Sivanathan et al., 2015).

A supernutrição perinatal influencia na diferenciação e super estimula a função das células  $\beta$ -pancreáticas, o que leva ao comprometimento a longo prazo da secreção de insulina (Aerts et al., 1990). Já foi observado que animais supernutridos no período lactacional apresentam hiperinsulinemia (Plagemann, 2010; Plagemann, 2011; Silva et al., 2016; Previante et al., 2020), elevação intra-hipotalâmica de insulina (Aerts et al., 1990), seguida por displasia hipotalâmica permanente, e assim, ao longo da vida, alterações metabólicas (Plagemann et al., 1998; Plagemann et al., 1999). No presente trabalho, embora a glicemia basal e o índice de TyG estejam inalterados em animais com obesidade infantil no DPN 60, o aumento da AUC do GTT revela uma intolerância à glicose e um desequilíbrio no metabolismo glicêmico, como já evidenciado na literatura (Costa et al., 2019; Souza et al., 2022).

Sabe-se que a resposta glicêmica observada no GTT está relacionada à resposta secretora de insulina por células  $\beta$ -pancreáticas e/ou à ação da insulina em seus tecidos-alvos (Park et al., 2021). A função das células  $\beta$ -pancreáticas desempenha um papel crucial na determinação do desenvolvimento de diabetes tipo 2 em indivíduos com obesidade. De acordo com van Vliet et al. (2020), as concentrações plasmáticas de insulina e a sua taxa de secreção, tanto em condições basais quanto após a ingestão de

glicose, tendem a ser significativamente mais elevadas em pessoas obesas não diabéticas em comparação com indivíduos magros. Esse aumento na secreção de insulina e nas concentrações plasmáticas pode, em muitos casos, compensar a resistência à insulina, mantendo a glicemia em jejum e a tolerância oral à glicose dentro dos limites normais. Entretanto, conforme observado por Gastaldelli et al. (2004) e Weyer et al. (1999), a progressiva deterioração da função das células  $\beta$  eventualmente resulta em um controle glicêmico deficiente. Dessa forma, é possível que nos animais com obesidade infantil no início da fase adulta (DPN 60) do presente trabalho, a resistência à insulina esteja começando a se instalar, mas é superada pelo aumento da secreção insulínica, e por isso a glicemia de jejum e o índice TyG estão inalterados.

A insulina é um hormônio anabólico que estimula a lipogênese e inibe a lipólise, portanto, a hiperinsulinemia está relacionada ao aumento do acúmulo lipídico nos tecidos adiposos. Assim, a lipogênese estimulada pela hiperinsulinemia é coerente com a falta do aumento das concentrações de colesterol total e HDL em animais com supernutrição lactacional no DPN 60. Quanto à menor concentração de triacilgliceróis nos animais SL, pode ter sido pela menor ingestão alimentar da dieta padrão oferecida aos animais, que é composta por 55% carboidratos, 22% de proteína, 4,5 % de lipídios e outros constituintes (vitaminas, fibras) (Nuvilab CR-1, NUVITAL®, Curitiba, PR, Brasil), e conseqüentemente, o consumo em menor quantidade desses macronutrientes.

No fígado dos animais SL no DPN 60, houve maior concentração de colesterol e triacilgliceróis. Assim como nos miócitos de MG e MS foi observado acúmulo lipídico. Sabe-se que a insulina é capaz de estimular indiretamente a atividade da HMG-CoA redutase, enzima importante na síntese de colesterol (Nelson & Cox, 2014). Essa enzima catalisa a reação que converte HMG-CoA em mevalonato (Nelson & Cox, 2014), e sua síntese é controlada por uma família de proteínas SREBP, que são ativadores da transcrição de genes tais como o da HMG-CoA-redutase (Salles, 2019). Interessantemente, dados demonstram que a insulina induz a expressão da proteína SREBP em adipócitos, em hepatócitos e em tecido muscular (Kim et al., 1998; Eberlé et al., 2004; Krycer et al., 2010). Assim, presume-se que a possível hiperinsulinemia presente no grupo SL no DPN 60, estimulou a lipogênese tanto no fígado quanto na musculatura esquelética avaliada.

Corroborando com os resultados de acúmulo lipídico em tecidos ectópicos ao tecido adiposo, estudos anteriores demonstraram que indivíduos com obesidade tendem a apresentar acúmulo lipídico no fígado e rins, podendo causar lipotoxicidade e lesões teciduais (Lakkis & Weir, 2018; Li et al., 2020). Ratos com obesidade induzida por dieta

hiperlipídica também apresentam acúmulo de lipídeos no fígado e lipotoxicidade hepática (Fujita et al., 2018; Jiang et al., 2022). Além disso, dados prévios no nosso grupo reportaram que animais SL no DPN 74 apresentam aumento do acúmulo de triacilgliceróis e aumento da lipogênese *de novo* no fígado (Souza et al., 2023).

Interessantemente, este acúmulo de lipídeos no fígado de animais com obesidade lactacional no DPN 60 está associado a um aumento da concentração de MDA hepático, que é um dos produtos finais da peroxidação lipídica. De fato, estes dados estão de acordo com dados prévios que evidenciaram aumento de MDA hepático em animais SL com 180 dias, associado à microesteatose e resistência à insulina neste órgão (Conceição et al., 2013). Durante este processo, intermediários reativos podem causar danos estruturais às membranas celulares, resultando em aumento da permeabilidade e vazamento de lipídios das membranas para o meio extracelular (Gaschler & Stockwell, 2017). Especificamente, o MDA pode interagir com proteínas e outras moléculas, causando mais danos celulares (Wong-Ekkabut et al., 2007; Diaz et al., 2016).

A tendência ao aumento da concentração de ácido úrico plasmático, pode representar uma atividade antioxidante endógena (Mikami & Sorimachi, 2017). No entanto, nota-se que, mesmo com aumento da defesa antioxidante endógena, evidenciado pelo aumento do ABTS no fígado e ácido úrico plasmático, o dano oxidativo não foi evitado nos animais SL no início da vida adulta. Nesse contexto, está bem estabelecido que no quadro de obesidade o estresse oxidativo favorece a progressão de doenças hepáticas (Fromenty & Roden, 2023).

Sabe-se que com o aumento do depósito lipídico nos adipócitos, há alterações histológicas e bioquímicas, tais como migração de macrófagos que estimulam expressão, síntese e secreção de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$  e IL-6, sendo uma condição de inflamação crônica (Nascimento, 2021). As diversas citocinas pró-inflamatórias produzidas no tecido adiposo, são capazes de migrar sistemicamente e atingir tecidos periféricos (Santos, 2017). Embora não tenha sido observada a expressão de IL-6 no fígado, e demais citocinas pró-inflamatórias nos músculos esqueléticos avaliados neste trabalho, não significa que essas citocinas não sejam recrutadas nestes órgãos, de modo que elas podem apenas não estar sendo sintetizadas nesses locais. No entanto, foi observada uma tendência de aumento da expressão de RNAm de IL-1 $\beta$ , um dos principais mediadores da inflamação aguda, corroborando com dados que demonstram que camundongos com obesidade induzida por dieta apresentam maior expressão de RNAm de IL-1 $\beta$  no fígado (Negrin et al., 2014). Nesse contexto, a inflamação, mesmo leve, promove o aumento de ERO no tecido (Brenner et al., 2013), e isso pode ter

contribuído para o estresse oxidativo instalado no fígado de animais com obesidade lactacional no início da vida adulta. De fato, este dado pode ser corroborado por dados de Conceição et al. (2013), que mostraram um infiltrado inflamatório hepático associado a aumento da lipoperoxidação lipídica neste órgão em animais com obesidade infantil no DPN 180.

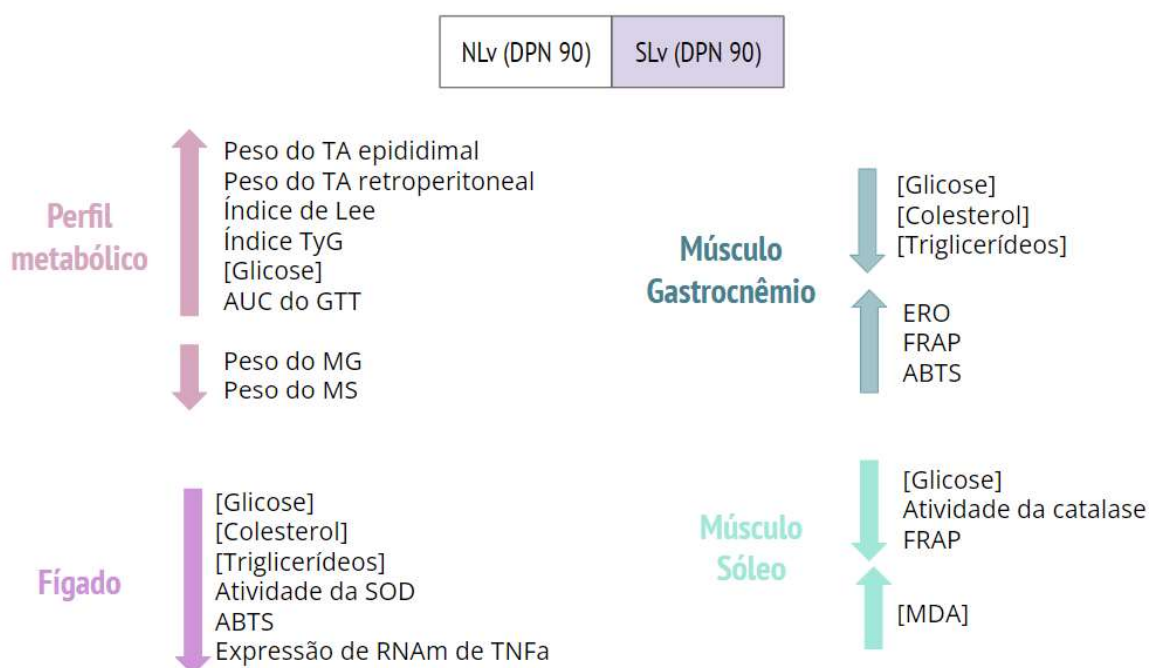
Como dito anteriormente, na musculatura esquelética avaliada, tanto no MG quanto MS, observou-se acúmulo lipídico nos miócitos, e isso pode ocorrer pela hiperinsulinemia. O acúmulo de triacilgliceróis nos miócitos já foi visto anteriormente em indivíduos com obesidade (Simoneau et al., 1999; Takagi et al., 2021). E neste quadro, a capacidade metabólica do músculo esquelético parece estar organizada em direção ao armazenamento ao invés de oxidação (Bandyopadhyay et al., 2006; Fritzen et al., 2020). O acúmulo lipídico está relacionado com o aumento do estresse oxidativo (Pérez-Torres et al., 2021), e é possível que esse acúmulo observado no presente trabalho esteja associado com o estresse oxidativo observado. No músculo esquelético gastrocnêmio, houve aumento da produção de ERO, que não foi mitigado pelo aumento da atividade da enzima SOD. No músculo sóleo, observou-se a presença de peroxidação lipídica e diminuição de GST, enzima do sistema antioxidante endógeno. Nesse sentido, o acúmulo lipídico observado nesses músculos, pode levar à produção excessiva de ERO e peroxidação lipídica, causando EO nas células musculares (Mengeste et al., 2020).

Ainda na musculatura esquelética animais com obesidade infantil no DPN 60, não foram observadas alterações no conteúdo de glicogênio muscular em MS e MG. Com a hiperinsulinemia, há aumento da expressão de GLUT4, então a glicose é capaz de entrar nos miócitos para ser oxidada e utilizada, e por isso não há aumento de síntese de glicogênio. Parece não ter ocorrido alteração na captação de glicose nos animais SL no DPN 60, mas sim uma redução na sua utilização, uma vez que a concentração de glicose estava inalterada (MG) ou aumentada (MS) nestes animais. Dessa forma, é provável que a obesidade lactacional promoveu alterações metabólicas no músculo esquelético, como acúmulo ectópico de lipídios, associado a aumento de ERO e lipoperoxidação, e consequentemente formação de intermediários lipídicos tóxicos (Mengeste et al., 2021), associado com redução da utilização da glicose muscular (MS).

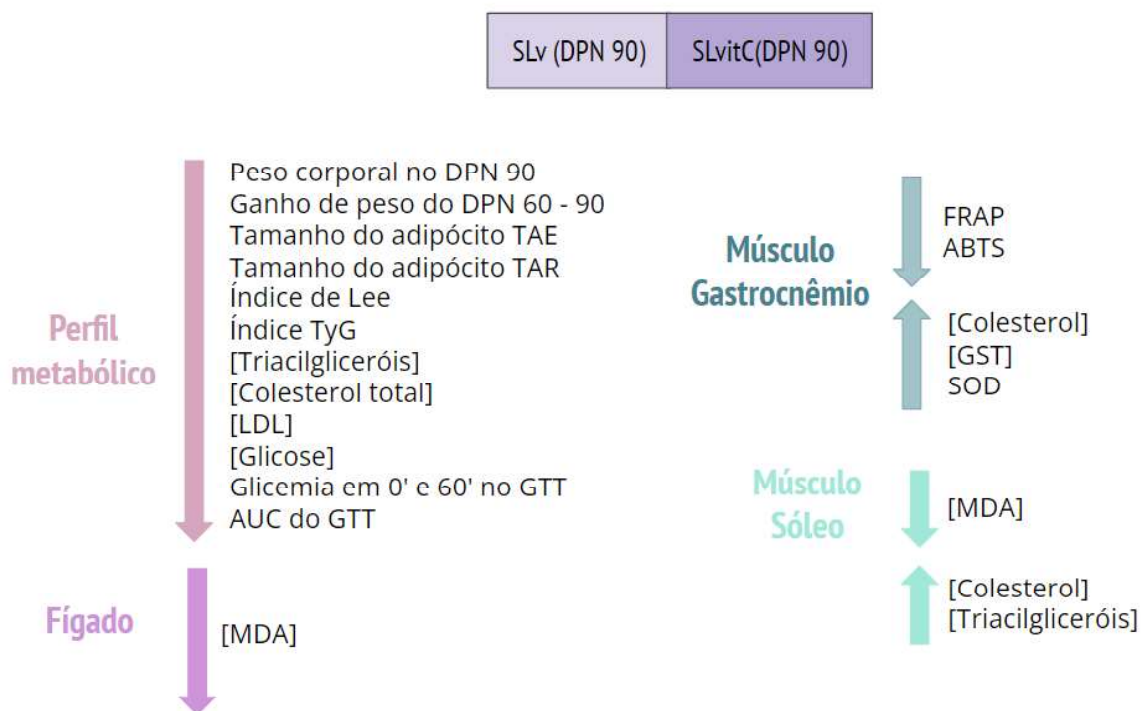
Em suma, a supernutrição lactacional levou a uma programação metabólica no início da fase adulta (DPN 60), que parece ter favorecido a diminuição da taxa metabólica basal no grupo SL, uma vez que observa-se acúmulo de tecido adiposo mesmo com menor ingestão alimentar. Além disso, este trabalho é pioneiro em demonstrar que o acúmulo de lipídeos em órgãos ectópicos ao tecido adiposo, como fígado e músculos

esqueléticos, pode ter favorecido uma leve inflamação e estresse oxidativo no fígado, além do EO na musculatura esquelética. Esse acúmulo lipídico possivelmente decorreu da hiperinsulinemia que ocorre nesse modelo de obesidade, estimulando a lipogênese. Uma vez que estas estruturas são chaves na regulação do metabolismo glicêmico, possivelmente o EO contribuiu para a instalação da intolerância à glicose em animais com obesidade infantil observada no início da fase adulta, provavelmente por reduzir a utilização muscular de glicose.

**Figura 24.** Resumo dos resultados estatisticamente significativos do Estudo 2 (NLv e SLv no DPN 90).



**Figura 25.** Resumo dos resultados estatisticamente significativos do Estudo 2 (SLv e SL vitC no DPN 90).



Como observado no resumo dos resultados na Figura 24, no DPN 90, o grupo SL apresentou maior peso do TAE e TAR, corroborando com dados da literatura que mostram que a programação metabólica no início da vida causa prejuízos até a vida adulta (Souza et al., 2022; Stopa et al., 2021). Além disso, o peso da musculatura esquelética do grupo SL, no DPN 90, foi menor que o grupo controle, de modo que a proporção mais alta de tecido adiposo do que de massa muscular em animais com obesidade lactacional na idade adulta pode levar à redução da taxa metabólica basal, facilitando o acúmulo de tecido adiposo, e sendo um indicador de risco de doenças crônicas e distúrbios metabólicos (Dada et al., 2017). Já a Figura 25 traz um resumo das principais alterações observadas após tratamento por 30 dias, na vida adulta (DPN 60-89), com vitamina C em animais com obesidade induzida por hiperlactação. A vitamina C atua como redutor, ou seja, doa um elétron a um substrato, enquanto é oxidada a um radical ascorbila - radical livre relativamente estável (Lykkesfeldt et al., 2014). Consequentemente, a vitamina C é um poderoso antioxidante com a capacidade de reduzir (“eliminar”) radicais livres e ERO.

No DPN 90, o peso corporal dos animais SLvitC foi menor que os SLv, assim como índice de Lee, sem alteração da ingestão alimentar. Apesar da redução de peso corporal, o peso do tecido adiposo branco visceral TAR não foi reduzido pela vitamina C, porém, o tamanho do adipócito foi reduzido em ambos os depósitos por este antioxidante. De fato, estudos anteriores confirmam esses achados, já que mostraram que a administração de

vitC por via oral regula a obesidade em camundongos machos e fêmeas, reduzindo a hipertrofia dos adipócitos viscerais (Jeon et al., 2023; Lee et al., 2019), e isso ocorre sem afetar o consumo alimentar (Lee et al., 2019). Além disso, a deposição de tecido adiposo subcutâneo também é reduzida pela vitamina C, acompanhada de perda de peso corporal (Kim et al., 2018). Sugere-se, então, que a vitamina C é capaz de reduzir o acúmulo lipídico nos depósitos de tecido adiposo epididimal e retroperitoneal, mostrando um possível efeito lipolítico. No entanto, o delta peso do grupo SLvitC não foi menor apenas que o grupo SL, mas também menor que o do grupo NL. Essa redução de peso é uma evidência de toxicidade (Sisinno & Oliveira-Filho, 2013).

O perfil lipídico do grupo SL não foi diferente do grupo NL, mas os animais que receberam VitC por 30 dias apresentaram diminuição da concentração de colesterol total, LDL, e triacilgliceróis, comparados ao grupo SL, além de aumento da concentração de HDL, comparado ao NL, demonstrando um impacto positivo desse antioxidante (Fig 25). Estudos anteriores mostraram que a vitamina C também reduziu a concentração plasmática de colesterol total e LDL em ratas obesas (Lee et al., 2019), corroborando com nossos achados

Observando o perfil glicêmico (Fig 24), presume-se que nesta fase da vida, ocorra a instalação da resistência à insulina no grupo SL. Isso é evidenciado pelo aumento do índice TyG, além da maior glicemia basal e intolerância à glicose (AUC do GTT), resultados corroborados por estudos anteriores (de Souza et al., 2022; Pavanello et al., 2022). Outra evidência da instalação da resistência à insulina, é que houve aumento de peso corporal desacompanhado de hipertrofia adipocitária. Considerando que a ação da insulina é lipogênica, a resistência à insulina é compatível com diminuição da síntese de triacilgliceróis nos adipócitos ocorrida no presente trabalho. A vitamina C também foi capaz de minimizar a resistência à insulina e intolerância à glicose nos ratos SL no presente estudo. Já foi demonstrado anteriormente que camundongos tratados com VitC exibiram melhora na hiperglicemia, hiperinsulinemia, na intolerância à glicose e à insulina em comparação com camundongos obesos não tratados (Jeon et al., 2023). Além disso, a vitamina C também é capaz de melhorar a sensibilidade à insulina em humanos diabéticos tipo 2 (Mason et al., 2016); e reduzir a glicemia de ratos com retinopatia diabética induzida por injeção de estreptozotocina (Jariyapongskul et al. 2007). No entanto, os mecanismos exatos pelos quais a vitamina C promove essa melhora no metabolismo glicêmico ainda não estão elucidados.

Observando as concentrações de glicose no fígado e músculo esquelético (MG e MS) do grupo SL (Fig 24), nota-se que há menor concentração deste substrato nesses

tecidos comparados ao grupo NL. Isso, associado ao aumento da glicemia, demonstra que a liberação de glicose está aumentada. É possível que essa maior liberação seja estimulada por aumento de corticosterona plasmática, uma vez que a homeostase energética também possui interferência dos glicocorticoides adrenais. Nos roedores, a corticosterona é o glicocorticoide envolvido no metabolismo energético (Palma et al., 2007), e em diferentes modelos de obesidade foi demonstrado o aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticoides (Bruce et al., 1982; Dubuc and Wilden, 1986). Especificamente no modelo de supernutrição lactacional, por volta dos 90 dias, há aumento da concentração plasmática de corticosterona (Souza et al., 2022; Souza et al., 2023). O grupo SLvitC apresenta concentrações de glicose no fígado e músculos estatisticamente semelhantes ao grupo SL, mas mesmo assim, há redução da glicemia e maior tolerância à glicose (Fig 25). Parece que, mesmo com aumento da liberação de glicose, a resistência à insulina nesse grupo é menor, uma vez que a glicose provavelmente está sendo captada e utilizada pelas células. Assim, os valores do perfil glicêmico de SLvitC tornam-se estatisticamente semelhantes ao grupo NL, ou seja, esse antioxidante contribui para a normalização da homeostase glicêmica.

Ao contrário do observado no DPN 60, no DPN 90 observa-se que há diminuição de deposição lipídica no fígado e músculo gastrocnêmio. Uma possibilidade para ocorrência desse quadro, é redução da insulinemia nesses animais, que pode ser consequência de uma falência das células  $\beta$ -pancreáticas. Para compensar a resistência insulínica, o pâncreas pode aumentar a produção de insulina, cujo aumento da demanda pode levar à exaustão e falência das células beta (Nascimento, 2018). Além disso, a lipotoxicidade e inflamação crônica também podem levar à disfunção dessas células (Nascimento, 2018). No grupo SLvitC, no qual há aumento de deposição lipídica nos músculos esqueléticos sóleo e gastrocnêmio, sugere-se que a vitamina C pode ter recuperado ou melhorado a função de células  $\beta$ -pancreáticas. Assim, a normalização da secreção insulínica pelo pâncreas permitiria a lipogênese adipocitária e ectópica ao tecido adiposo, além de melhora na tolerância à glicose e redução da resistência insulínica, já que o perfil lipídico é normalizado.

Considerando o fígado, no DPN 60 houve deposição de lipídios nos hepatócitos do grupo SL, além de desequilíbrio redox e dano oxidativo (peroxidação lipídica). Isso está de acordo com a literatura, que mostra que a obesidade é considerada o principal fator de risco para o desenvolvimento de Doenças hepáticas gordurosas não alcoólicas (Sattar et al., 2014), e o acúmulo lipídico aumenta o estresse oxidativo do retículo endoplasmático dos hepatócitos, contribuindo para lesão hepática, fibrose progressiva e até cirrose (Lee



et al., 2014). Já no DPN 90, o grupo SL apresentou redução lipídica nos hepatócitos, mas o desequilíbrio redox se manteve, uma vez que a SOD e o ABTS (parte da defesa antioxidante endógena) se apresentou reduzida. Interessantemente, houve redução de parâmetro inflamatório no fígado desse grupo, o que pode estar relacionado com a concentração aumentada de corticosterona (Souza et al., 2022; Souza et al., 2023), já que este hormônio esteroide também modula o sistema imunológico e reduz a resposta inflamatória (Glover & Pruett, 2006). Nesse contexto, o antioxidante apresentou um efeito benéfico, uma vez que no fígado do grupo SLvitC, houve redução da peroxidação lipídica, ou seja, menos dano oxidativo.

Já o perfil oxidativo dos músculos gastrocnêmio e sóleo do grupo SL tanto do DPN 60 quanto 90, foram marcados pelo estresse oxidativo e peroxidação lipídica (MS). A vitamina C promoveu o aumento das defesas antioxidantes endógenas, GST e atividade da SOD, acompanhada de uma atenuação do aumento de ERO no MG. Essas alterações benéficas induzidas pelo tratamento com vitamina C podem ser justificadas pelo efeito da vitamina C em estimular a biossíntese e ativação de enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase, catalase ou glutathione peroxidase (Gęgotek & Skrzydlewska, 2022). Além disso, o ácido ascórbico promove a atividade de diversos fatores de transcrição (Nrf2, Ref-1, AP-1), o que possibilita a expressão de genes que codificam proteínas antioxidantes (Gęgotek & Skrzydlewska, 2022). Além disso, foi demonstrado que a suplementação de vitamina C melhora a eliminação de ERO na musculatura esquelética de diabéticos (Mason et al., 2016). Isso parece ocorrer porque a concentração de ácido ascórbico aumenta o músculo esquelético de pessoas com diabetes tipo 2, e a vitamina C atua nas vias de sinalização redox no músculo e leva à maior sensibilidade à insulina (Vinayagamoorthi et al., 2008).

No DPN 60, o grupo SL parece apresentar hiperinsulinemia, que estimula a lipogênese e acúmulo lipídico adipocitário e ectópico ao TA. Esse acúmulo lipídico (com aumento de peso dos TA e aumento de peso corporal) parece promover a instalação do estresse oxidativo e inflamação de baixo grau no fígado, e estresse oxidativo na musculatura esquelética. Além de uma intolerância à glicose (observa-se redução de sua utilização no MS), a secreção beta pancreática está superestimada (secreção aumentada de insulina). Esse quadro, no início da vida adulta, já demonstra um prejuízo na homeostase energética e perfil morfométrico e metabólico causado pela supernutrição lactacional.

Já no DPN 90, parece haver de fato a instalação da resistência à insulina no grupo SL, além de uma possível falência das células beta-pancreáticas. Parece haver redução

da insulinemia e consequente menor deposição lipídica em tecidos periféricos, mesmo com manutenção de maior peso. Este grupo, então, apresenta glicemia aumentada e intolerância à glicose, além da resistência insulínica. A corticosterona plasmática, que é aumentada em animais SL, parece contribuir com o aumento da glicemia e com a modulação da resposta inflamatória (redução de TNA $\alpha$  no fígado). Então, com o tempo, parece haver uma progressão do prejuízo do controle glicêmico e, portanto, distúrbios metabólicos e da homeostase energética.

A suplementação com vitamina C atenuou ou mesmo reverteu a diminuição dos conteúdos lipídicos no fígado e músculos esqueléticos induzidos pela obesidade lactacional na idade adulta, acompanhadas, como já dito, por diminuição dos lipídios circulantes. No entanto, o tratamento com esse antioxidante não alterou a menor concentração de glicose no fígado e músculos esqueléticos nesses animais. Dessa forma, como dito anteriormente, a possível redução na captação de glicose induzida pela resistência à insulina está associada a distúrbios da homeostase glicêmica sistêmica em animais com obesidade infantil da idade adulta. Porém, a melhora deste quadro induzida pela vitamina C parece envolver um aumento na utilização de glicose por tais órgãos, que justificaria a falta de efeito da vitamina C nas concentrações de glicose hepática e musculares, associado à melhora na resistência à insulina e no perfil glicêmico sistêmico. Assim, essa segunda parte do trabalho também demonstra pela primeira vez que é a redução do estresse oxidativo em órgãos-chaves na homeostase glicêmica, induzida pela vitamina C, esteja associada à melhora na resistência insulínica e do perfil glicêmico periférico por este antioxidante em animais com obesidade infantil.

A hipótese do trabalho foi parcialmente aceita. Era esperado que o grupo SL apresentasse maior peso corporal e alteração no perfil glicêmico no DPN 60 e 90, associados com aumento do estresse oxidativo e danos oxidativos nos órgãos avaliados. No entanto, a redução do perfil inflamatório em animais com obesidade infantil na idade adulta mais avançada foi inesperado. A hipótese de que o tratamento com vitamina C durante a fase adulta, por 30 dias, seria capaz de mitigar os efeitos negativos da programação metabólica por supernutrição lactacional foi aceita. O tratamento com vitamina C reduziu, e em alguns parâmetros reverteu, os desequilíbrios metabólicos e oxidativos nos principais órgãos-chaves da homeostase energética induzidos pela super nutrição na lactação. No entanto, não se pode excluir a evidência de uma certa toxicidade por parte da vitamina C, que causou redução do delta peso no grupo SL.

## 7. CONCLUSÕES

Em síntese, o presente trabalho é pioneiro em demonstrar que as alterações metabólicas dos animais com obesidade induzida por supernutrição lactacional estão associadas ao dano oxidativo no fígado e músculo esquelético, órgãos envolvidos-a homeostase glicêmica, no início da fase adulta (DPN 60). Além disso, mais tardiamente na vida adulta, aos 90 dias de vida, os animais SL continuam apresentando maior adiposidade sem aumento de ingesta alimentar, além de ainda apresentarem os prejuízos metabólicos e oxidativos. Além disso, este estudo evidenciou pela primeira vez na literatura que o tratamento com vitamina C por 30 dias na idade adulta foi capaz de mitigar, e em alguns parâmetros reverter, os desequilíbrios metabólicos e oxidativos no fígado e músculos esqueléticos induzidos pela supernutrição da lactação, sugerindo que o EO contribui para as alterações metabólicas observadas em ratos machos adultos com obesidade infantil.

## REFERÊNCIAS

- Aasheim ET, Bohmer T. **Low preoperative vitamin levels in morbidly obese patients: A role of systemic inflammation?** Surg Obes Relat Dis 2008;4:779–780.
- Abreu P, Vitzel KF, Monteiro IC, Lima TI, Queiroz AN, Leal-Cardoso JH, Hirabara SM, Ceccatto VM. **Effects of endurance training on reduction of plasma glucose during high intensity constant and incremental speed tests in Wistar rats.** Braz J Med Biol Res. 2016 Oct 24;49(11):e5226. doi: 10.1590/1414-431X20165226.
- Acquarone E, Monacelli F, Borghi R, Nencioni A, Odetti P. **Resistin: A reappraisal.** Mech Ageing Dev. 2019 Mar;178:46-63. doi: 10.1016/j.mad.2019.01.004. Epub 2019 Jan 14. PMID: 30650338.
- Aebi H. **Heterogeneity of Erythrocyte Catalase II: Isolation and Characterization of Normal and Variant Erythrocyte Catalase and Their Subunits.** The FEBS Journal, v.48(1), p.137-145, 1974.
- Aires, Margarida de Mello. **Fisiologia.** 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.
- Ahmad K, Choi I, Lee YH. **Implications of Skeletal Muscle Extracellular Matrix Remodeling in Metabolic Disorders: Diabetes Perspective.** Int J Mol Sci. 2020 May 28;21(11):3845. doi: 10.3390/ijms21113845.
- Al Saedi A, Debruin DA, Hayes A, Hamrick M. **Lipid metabolism in sarcopenia.** Bone. 2022 Nov;164:116539. doi: 10.1016/j.bone.2022.116539.
- Ansar S, Iqbal M. **Ascorbic acid inhibits ferric nitrilotriacetate induction of ornithine decarboxylase, DNA synthesis, oxidative stress, and hepatotoxicity in rats.** Toxicol Ind Health. 2015 Nov;31(11):1008-14. doi: 10.1177/0748233713493824.
- Argente-Arizón P, Ros P, Díaz F, Fuente-Martin E, Castro-González D, Sánchez-Garrido MA, Barrios V, Tena-Sempere M, Argente J, Chowen JA. **Age and sex dependent effects of early overnutrition on metabolic parameters and the role of neonatal androgens.** Biol. Sex Differ. 7 (2016) 26, , <https://doi.org/10.1186/s13293-016-0079-5>.
- Bambace, C. et al. **Adiponectin gene expression and adipocyte diameter: a comparison between epicardial and subcutaneous adipose tissue in men.** Cardiovasc. Pathol. 20, e153–e156 (2011).

- Bandyopadhyay GK, Yu JG, Ofrecio J, Olefsky JM. **Increased malonyl-CoA levels in muscle from obese and type 2 diabetic subjects lead to decreased fatty acid oxidation and increased lipogenesis; thiazolidinedione treatment reverses these defects.** Diabetes. 2006;55(8):2277-2285.
- Barbosa Kb, Costa Nm, Alfenas Rc, De Paula So, Minim Vp, Bressan J. **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** Rev Nutr, 23,2010.
- Barish, G.D., Narkar, V.A., & Evans, R.M. (2006) **PPAR $\alpha$ : a dagger in the heart of the metabolic syndrome.** J. Clin. Invest. 116, 590–597.
- Barker DJ. **In utero programming of chronic disease.** Clin Sci (Lond). 1998 Aug;95(2):115-28.
- Barreiros, A. L. B. S.; David, J. M.; David, J. P. **Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- Bazotte RB, Silva LG, Schiavon FP. **Insulin resistance in the liver: deficiency or excess of insulin?** Cell Cycle. 2014;13(16):2494-500. doi: 10.4161/15384101.2014.947750. PMID: 25486190.
- Bei F, Jia J, Jia YQ, Sun JH, Liang F, Yu ZY, Cai W. **Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats.** Lipids Health Dis. 2015 Aug 26;14:96. doi: 10.1186/s12944-015-0094-2.
- Bernardis LL, Patterson BD. **Correlation between "Lee Index" and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions.** J Endocrinol., v. 40, p. 527-528, 1968.
- Bell JA, Reed MA, Consitt LA, et al. **Lipid partitioning, incomplete fatty acid oxidation, and insulin signal transduction in primary human muscle cells: effects of severe obesity, fatty acid incubation, and fatty acid translocase/CD36 overexpression.** J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(7):3400-3410.
- Bielawiec P, Harasim-Symbor E, Sztolsztener K, Konstantynowicz-Nowicka K, Chabowski A. **Attenuation of Oxidative Stress and Inflammatory Response by Chronic Cannabidiol Administration Is Associated with Improved n-6/n-3 PUFA Ratio in the White and Red Skeletal Muscle in a Rat Model of High-Fat Diet-Induced Obesity.** Nutrients. 2021 May 11;13(5):1603. doi: 10.3390/nu13051603.
- Boff, Sérgio Ricardo. **A fibra muscular e fatores que interferem no seu fenótipo.** Acta fisiátrica 15.2 (2016): 111-116.
- Bradford, M.M., 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** Anal. Biochem. 72, 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brenner, C., Galluzzi L., Kepp, O., Kroemer, G. **Decoding cell death signals in liver inflammation,** Journal of Hepatology, Volume 59, Issue 3, 2013, Pages 583-594, ISSN 0168-8278, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.03.033>
- Buehler PW, D'Agnillo F, Hoffman V, Alayash AI. **Effects of endogenous ascorbate on oxidation, oxygenation, and toxicokinetics of cell-free modified hemoglobin after exchange transfusion in rat and guinea pig.** J Pharmacol Exp Ther. 2007 Oct;323(1):49-60. doi: 10.1124/jpet.107.126409.
- Cahill, G.F., Jr. (2006) **Fuel metabolism in starvation.** Annu.Rev. Nutr. 26, 1–22.
- Cohen, P.; Kajimura, S. **The cellular and functional complexity of thermogenic fat.** Nature Reviews Molecular Cell Biology, 22, n. 6, p. 393-409, 2021.
- Canoy D, Wareham N, Welch A, et al. **Plasma ascorbic acid concentrations and fat distribution in 19,068 British men and women in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Norfolk cohort study.** Am J Clin Nutr 2005;82:1203–1209.
- Cavaliere G, Trinchese G, Bergamo P, De Filippo C, Mattace Raso G, Gifuni G, Putti R, Moni BH, Canani RB, Meli R, Mollica MP. **Polyunsaturated Fatty Acids Attenuate Diet Induced Obesity**

- and Insulin Resistance, Modulating Mitochondrial Respiratory Uncoupling in Rat Skeletal Muscle.** PLoS One. 2016 Feb 22;11(2):e0149033. doi: 10.1371/journal.pone.0149033.
- Chang BJ, Jang BJ, Son TG, Cho IH, Quan FS, Choe NH, Nahm SS, Lee JH. **Ascorbic acid ameliorates oxidative damage induced by maternal low-level lead exposure in the hippocampus of rat pups during gestation and lactation.** Food Chem Toxicol. 2012 Feb;50(2):104-8. doi: 10.1016/j.fct.2011.09.043.
- Cherif A, Roelands B, Meeusen R, Chamari K. **Effects of Intermittent Fasting, Caloric Restriction, and Ramadan Intermittent Fasting on Cognitive Performance at Rest and During Exercise in Adults.** Sports Med. 2016 Jan;46(1):35-47. doi: 10.1007/s40279-015-0408-6.
- Coleman, R.S. & Mashek, D.G. (2011) **Mammalian triacylglycerol metabolism: synthesis, lipolysis, and signaling.** Chem. Rev. 111,6359–6386.
- Conceição, EPS et al. **Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition — role of insulin resistance.** J Nutr Biochem. v. 24 p. 81-87, 2013.
- Conceição, EPS, Moura EG, Carvalho JC, Oliveira E, Lisboa PC. (2015). **Early redox imbalance is associated with liver dysfunction at weaning in overfed rats.** The Journal of Physiology, 593(21), 4799–4811. doi:10.1113/jp271189
- Conceição EP, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TA, Peixoto-Silva N, Passos MC, Moura EG, Lisboa PC. **Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition--role of insulin resistance.** J Nutr Biochem. 2013 Jan;24(1):81-7. doi: 10.1016/j.jnutbio.2012.02.010.
- Costa VMG, Andreazzi AE, Bolotari M, Lade CG, Guerra MO, Peters VM. **Effect of postnatal overfeeding on the male and female Wistar rat reproductive parameters.** Journal of Developmental Origins of Health and Disease. 2019;10(6):667-675. doi:10.1017/S2040174419000163
- Dada, RP et al., **Relação entre nível de atividade física em lazer, antropometria, composição corporal e aptidão física de mulheres submetidas à cirurgia bariátrica e um grupo equivalente não operado.** ABCD, arq. bras. cir. dig. 30 (04).Oct-Dec 2017. <https://doi.org/10.1590/0102-6720201700040006>
- Dalle Donne I, Aldini G, Carini M et al. **Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression.** J Cell Mol Med 2006; 2: 389–406
- De Souza CF, Stopa LRS, Santos GF, Takasumi LCN, Martins AB, Garnica-Siqueira MC,..., Uchoa, ET (2018). **Estradiol protects against ovariectomy-induced susceptibility to the anabolic effects of glucocorticoids in rats.** Life Sciences. doi:10.1016/j.lfs.2018.12.037
- De Souza CF, Stopa LRS, Martins AB, Wunderlich ALM, Lopes GM, Zaia DAM, Zaia CTBV, de Andrade FG, Leite CM, Uchoa ET. **Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary-adrenal axis in male rats.** Life Sci. 2022 Sep 1;304:120721. doi: 10.1016/j.lfs.2022.120721.
- Diaz, A.C.M.. **Impact of lipid peroxidation on the physiology and pathophysiology of cell membranes,** Front. Physiol. 7 (2016).
- Drehmer E, Navarro-Moreno MÁ, Carrera S, Villar VM, Moreno ML. **Oxygenic metabolism in nutritional obesity induced by olive oil.** The influence of vitamin C. Food Funct. 2019 Jun 19;10(6):3567-3580. doi: 10.1039/c8fo02550a.
- Ellulu, M.S. **Obesity, cardiovascular disease, and role of vitamin C on inflammation: a review of facts and underlying mechanisms.** Inflammopharmacol 25, 313–328 (2017). <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0314-7>
- Epstein, L. H., Wing, R. R., & Valoski, A. (1985). **Childhood Obesity. Pediatric Clinics of North America,** 32(2), 363–379. doi:10.1016/s0031-3955(16)34792-7.

- Esrefoglu, M., Akinci, A., Taslidere, E., Elbe, H., Cetin, A., & Ates, B. (2016). **Ascorbic acid and beta-carotene reduce stress-induced oxidative organ damage in rats.** *Biotechnic & Histochemistry*, 91(7), 455–464. doi:10.1080/10520295.2016.1220019
- Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM (2002). **Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes.** *Endocr Rev* 23:599–622
- Falcão-Tebas F, Kuang J, Arceri C, Kerris JP, Andrikopoulos S, Marin EC, McConell GK. **Four weeks of exercise early in life reprograms adult skeletal muscle insulin resistance caused by a paternal high-fat diet.** *J Physiol.* 2019 Jan;597(1):121-136. doi: 10.1113/JP276386.
- Falcão-Tebas F, Marin EC, Kuang J, Bishop DJ, McConell GK. **Maternal exercise attenuates the lower skeletal muscle glucose uptake and insulin secretion caused by paternal obesity in female adult rat offspring.** *J Physiol.* 2020 Oct;598(19):4251-4270. doi: 10.1113/JP279582.
- Faludi AA et al. **Atualização da Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose - 2017.** *Arq Bras Cardiol* 2017; 109( 2Supl. 1): 1- 76.
- Ferreira, A. L. A.; Matsubara, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo.** *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- Federici, G., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. **Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects.** *Aquat. Toxicol.* 84, 415–430. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.07.009>
- Freitas, M C; Ceschini, F L; Ramallo, B T. **Resistência à insulina associado à obesidade: Efeitos anti-inflamatórios do exercício físico.** *R. Bras. Ci. e Mov.* 2014; 22(3): 139-147.
- Freitas CM, Nascimento LCP, Braz, GRF, Andrade-Silva SC, Lima-Junior NC, de Araujo Silva T, Lagranha, C. J. (2018). **Mitochondrial impairment following neonatal overfeeding: A comparison between normal and ischemic-reperfused hearts.** *Journal of Cellular Biochemistry.* doi:10.1002/jcb.28009
- Friedman JE, Caro JoséF, Pories WJ, Azevedo JL, Dohm G. **Glucose metabolism in incubated human muscle: effect of obesity and non-insulin-dependent diabetes mellitus.** *Metabolism.* 1994;43(8):1047-1054.
- Fritzen AM, Lundsgaard A-M, Kiens B. **Tuning fatty acid oxidation in skeletal muscle with dietary fat and exercise.** *Nat Rev Endocrinol.* 2020;16(12):683-696.
- Fromenty B, Roden M. **Mitochondrial alterations in fatty liver diseases.** *J Hepatol.* 2023 Feb;78(2):415-429. doi: 10.1016/j.jhep.2022.09.020.
- Fujita N, Aono S, Karasaki K, Sera F, Kurose T, Fujino H, Urakawa S. **Changes in lipid metabolism and capillary density of the skeletal muscle following low-intensity.** 2018.
- Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, et al. **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** *J Clin Invest* 2004;114:1752–1761.
- Gaschler MM, Stockwell BR. **Lipid peroxidation in cell death.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2017 Jan 15;482(3):419-425. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086. Epub 2017 Feb 3.
- Gaster M. **Metabolic flexibility is conserved in diabetic myotubes.** *J Lipid Res.* 2007;48(1):207-217.
- Garcia-Diaz DF, Campion J, Milagro FI, Boque N, Moreno-Aliaga MJ, Martinez JA. **Vitamin C inhibits leptin secretion and some glucose/lipid metabolic pathways in primary rat adipocytes.** *J Mol Endocrinol.* 2010 Jul;45(1):33-43. doi: 10.1677/JME-09-0160. Epub 2010 Apr 16.
- Garcia-Diaz DF, Johnson MH, de Mejia EG. **Anthocyanins from fermented berry beverages inhibit inflammation-related adiposity response in vitro.** *J Med Food.* 2015 Apr;18(4):489-96. doi: 10.1089/jmf.2014.0039.
- Gęgotek A, Skrzydlewska E. **Ascorbic acid as antioxidant.** *Vitam Horm.* 2023;121:247-270. doi: 10.1016/bs.vh.2022.10.008.

- Ghaben, A. L.; Scherer, P. E. **Adipogenesis and metabolic health.** *Nature Reviews Molecular Cell HayasakiBiology*, 20, n. 4, p. 242-258, 2019/04// 2019.
- Goodyear LJ, Giorgino F, Sherman LA, Carey J, Smith RJ, Dohm GL. **Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate-1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3-kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects.** *J Clin Invest.* 1995;95(5):2195-2204.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. **Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008 May;9(5):367-77. doi: 10.1038/nrm2391.
- Harms, M.; Seale, P. **Brown and beige fat: Development, function and therapeutic potential.** *Nat. Med.* 2013;19, 1252–1263.
- Halliwell B. **Free radicals and antioxidants: Updating a personal view.** *Nutr. Rev.* 2012, 70, 257–265.
- Halliwell, B. and Gutteridge, M.C. (1985) **The Chemistry of Oxygen Radicals and Other Oxygen-Derived Species.** In: Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C., Eds., *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford, 20-66.
- Halberg, N. et al. **Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue.** *Mol. Cell. Biol.* 29, 4467–4483 (2009).
- Hayasaki H, Shimada M, Kanbara K, Watanabe M. **Regional difference in muscle fiber type and glucose uptake of mouse gastrocnemius at rest.** *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2001;47.
- Hey-Mogensen M, Højlund K, Vind BF, Wang L, Dela F, Beck-Nielsen H, Fernström M, Sahlin K. **Effect of physical training on mitochondrial respiration and reactive oxygen species release in skeletal muscle in patients with obesity and type 2 diabetes.** *Diabetologia.* 2010 Sep;53(9):1976-85. doi: 10.1007/s00125-010-1813-x.
- Higuchi M, Disting GJ, Peshavariya H, et al. **Differentiation of Human adipose-derived stem cells into fat involves reactive oxygen species and Forkhead box O1 mediated upregulation of antioxidant enzymes.** *Stem Cells Dev* 2013;22:878–888.
- Hira HS, Kaur A, Shukla A. **Acute neuromuscular weakness associated with dengue infection.** *J Neurosci Rural Pract:* 2012;3(1):36-9
- Hopkins M, Gibbons C, Blundell J. 2023 **Fat-free mass and resting metabolic rate are determinants of energy intake: implications for a theory of appetite control.** *Phil. Trans. R. Soc. B* 378: 20220213. <https://doi.org/10.1098/rstb.2022.0213>
- Huang K, Kornas N, Steinbeck K, Loughnan G, Caterson I D. **Resting metabolic rate in severely obese diabetic an nondiabetic subjects.** *Obes Res.* 2004;12(5):840-45.
- Huang F, Zhu P, Wang J, Chen J, Lin W. **Postnatal overfeeding induces hepatic microRNA-221 expression and impairs the PI3K/AKT pathway in adult male rats.** *Pediatr Res.* 2021 Jan;89(1):143-149. doi: 10.1038/s41390-020-0877-7.
- Ikeda, K.; Maretich, P.; Kajimura, S. **The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes.** *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 29, n. 3, p. 191-200, 2018.
- Jariyapongskul A, Rungjaroen T, Kasetsuwan N, Patumraj S, Seki J, Niimi H (2007) **Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats.** *Microvasc Res* 74:32–38. doi:10.1016/j.mvr.2007.03.002
- Jeffery, E., Church, C., Holtrup, B. et al. **Rapid depot-specific activation of adipocyte precursor cells at the onset of obesity.** *Nat Cell Biol* 17, 376–385 (2015).
- Jeon S, Lee J, Shin Y, Yoon M. **Ascorbic acid reduces insulin resistance and pancreatic steatosis by regulating adipocyte hypertrophy in obese ovariectomized mice.** *Can J Physiol Pharmacol.* Jun 1;101(6):294-303. doi: 10.1139/cjpp-2022-0339.
- Jiang JJ, Zhang GF, Zheng JY, Sun JH, Ding SB. **Targeting Mitochondrial ROS-Mediated Ferroptosis by Quercetin Alleviates High-Fat Diet-Induced Hepatic Lipotoxicity.** *Front Pharmacol.* 2022 Apr 12;13:876550. doi: 10.3389/fphar.2022.876550.

- Júnior, A. J. S. (2017). **Adipocinas: a relação endócrina entre obesidade e diabetes tipo II. RBONE -Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**, 11(63), 135-144. <http://www.rbone.com.br/index.php/rbone/article/view/504>
- Kartiosuo N, Ramakrishnan R, Lemeshow S, Juonala M, Burns TL, Woo JG, Jacobs DR Jr, Daniels SR, Venn A, Steinberger J, Urbina EM, Bazzano L, Sabin MA, Hu T, Prineas RJ, Sinaiko AR, Pahkala K, Raitakari O, Dwyer T. **Predicting overweight and obesity in young adulthood from childhood body-mass index: comparison of cutoffs derived from longitudinal and cross-sectional data. Lancet Child Adolesc Health.** 2019 Nov;3(11):795-802. doi: 10.1016/S2352-4642(19)30204-4.
- Keen JH, Habig WH, Jakoby WB, 1976. **Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases.** J. Biol. Chem. 251, 6183–6188. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(20\)81842-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(20)81842-0)
- Kim B, Choi KM, Yim HS, Park HT, Yim JH, Lee MG. **Adipogenic and Lipolytic Effects of Ascorbic Acid in Ovariectomized Rats.** Yonsei Med J. 2018 Jan;59(1):85-91. doi: 10.3349/ymj.2018.59.1.85.
- Krotkiewski, M., Björntorp, P., Sjöström, L. & Smith, U. **Impact of obesity on metabolism in men and women.** Importance of regional adipose tissue distribution. J. Clin. Invest. 72, 1150–1162 (1983).
- Kumar, S., & Kelly, A. S. (2017). **Review of Childhood Obesity.** Mayo Clinic Proceedings, 92(2), 251–265. doi:10.1016/j.mayocp.2016.09.017
- Kusminski, C. M.; Bickel, P.E.; Scherer, P.E. **Targeting adipose tissue in the treatment of obesity-associated diabetes.** Nat Rev Drug Discov, 15, n. 9, p. 639-660, Sep 2016.
- Lakkis, Jay I.; Weir, Mathew R. . (2018). **Obesity and Kidney Disease. Progress in Cardiovascular Diseases**, S0033062018301282–. doi:10.1016/j.pcad.2018.07.005
- Lakshman, R., Elks, C. E., & Ong, K. K. (2012). **Childhood Obesity.** Circulation, 126(14), 1770–1779. doi:10.1161/circulationaha.111.04
- Laurencekiene, J. et al. **Regulation of lipolysis in small and large fat cells of the same subject.** J. Clin. Endocrinol. Metab. 96, E2045–E2049 (2011)
- Lykkesfeldt J, Michels AJ, Frei B. **Vitamin C.** Adv Nutr. 2014 Jan 1;5(1):16-8. doi: 10.3945/an.113.005157.
- Lazzer S, Boirie Y, Montaurier C, Vernet J, Meyer M, Vermorel M. **A weight reduction program preserves fat-free mass but not metabolic rate in obese adolescents.** Obes Res. 2004;12(2):233-40.
- Lee H, Lee YJ, Choi H, et al. **Reactive oxygen species facilitate adipocyte differentiation by accelerating mitotic clonal expansion.** J Biol Chem 2009;284:10601–10609.
- Lee J.H., Friso S., Choi S.W. **Epigenetic mechanisms underlying the link between non-alcoholic fatty liver diseases and nutrition.** Nutrients. 2014; 6:3303–3325. doi: 10.3390/nu6083303.
- Lee H, Ahn J, Shin SS, Yoon M. **Ascorbic acid inhibits visceral obesity and nonalcoholic fatty liver disease by activating peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in high-fat-diet-fed C57BL/6J mice.** Int J Obes (Lond). 2019 Aug;43(8):1620-1630. doi: 10.1038/s41366-018-0212-0.
- Li, Zhuo; Li, Jia; Miao, Xiao; Cui, Wenpeng; Miao, Lining; Cai, Lu . (2020). **A minireview: Role of AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling in obesity-related kidney injury.** Life Sciences, (), 118828–. doi:10.1016/j.lfs.2020.118828
- Liu Y, Fu X, Chen Z, Luo T, Zhu C, Ji Y, Bian Z. **The Protective Effects of Sulforaphane on High-Fat Diet-Induced Obesity in Mice Through Browning of White Fat.** Front Pharmacol. 2021 Apr 29;12:665894. doi: 10.3389/fphar.2021.665894.
- Liu HW, Mahmood S, Srinivasan M, Smiraglia DJ, Patel MS. **Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats.** J Nutr Biochem. 2013 Nov;24(11):1859-69. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.05.002.



- Livak KJ, Schmittgen TD. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lubrano C, Valacchi G, Specchia P et al. **Integrated haematological profiles of redox status, lipid, and inflammatory protein biomarkers in benign obesity and unhealthy obesity with metabolic syndrome.** *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015; 490613
- Maciejczyk M, Mikoluc B, Pietrucha B. **Oxidative stress, mitochondrial abnormalities and antioxidant defense in Ataxia-telangiectasia, Bloom syndrome and Nijmegen breakage syndrome.** *Redox Biology*, vol. 11, pp. 375–383, 2017.
- Maddux BA, See W, Lawrence JC, Goldfine AL, Goldfine ID, Evans JL (2001) **Protection against oxidative stress-induced insulin resistance in rat L6 muscle cells by micromolar concentrations of alpha-lipoic acid.** *Diabetes* 50:404–410
- Maier, T., Jenni, S., & Ban, N. (2006) **Architecture of mammalian fatty acid synthase at 4.5 Å resolution.** *Science* 311, 1258–1262.
- Malafaia AB et al. **Indução de obesidade com sacarose em ratos.** *ABCD, arq. bras. cir. dig.* 26, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202013000600005>
- Mason SA, Della Gatta PA, Snow RJ, Russell AP, Wadley GD. **Ascorbic acid supplementation improves skeletal muscle oxidative stress and insulin sensitivity in people with type 2 diabetes: Findings of a randomized controlled study.** *Free Radic Biol Med*. 2016 Apr;93:227-38. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.006.
- Matsubara M, Katayose S, Maruoka S. **Decreased plasma adiponectin concentrations in nondiabetic women with elevated homeostasis model assessment ratios.** *Eur J Endocrinol*. 2003 Mar;148(3):343-50. doi: 10.1530/eje.0.1480343.
- Melo, C. M. de, Tirapegui, J., & Ribeiro, S. M. L. (2008). **Gasto energético corporal: conceitos, formas de avaliação e sua relação com a obesidade.** *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 52(3), 452–464. doi:10.1590/s0004-27302008000300005
- Mengeste AM, Rustan AC, Lund J. **Skeletal muscle energy metabolism in obesity.** *Obesity (Silver Spring)*. 2021 Oct;29(10):1582-1595. doi: 10.1002/oby.23227.
- Meyer, L. K., Ciaraldi, T. P., Henry, R. R., Wittgrove, A. C. & Phillips, S. A. **Adipose tissue depot and cell size dependency of adiponectin synthesis and secretion in human obesity.** *Adipocyte* 2, 217–226 (2013).
- Minamoto,V.B. **Classificação e adaptações das fibras musculares: uma revisão.** *Fisioterapia e pesquisa*, v. 12, n. 3, p. 50-55, 2005
- Mozeš Š, Šefčíková Z, Raček L, **Long-term effect of altered nutrition induced by litter size manipulation and cross-fostering in suckling male rats on development of obesity risk and health complications,** *Eur. J. Nutr.* 53 (2014) 1273–1280, <https://doi.org/10.1007/s00394-013-0630-7>.
- Muoio, D.M. & Newgard, C.B. (2008) **Molecular and metabolic mechanisms of insulin resistance and b-cell failure in diabetes.** *Nat.Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 193–205.
- Nascimento, S. S. C., Queiroz, J. L. C., Medeiros, A. F., Nunes, A. C. F., Piuvezam, G. Maciel, B. L. L., Passos, T. S., & Morais,A. H. A. (2021). **What are the mechanisms of action of anti-inflammatory agentes in adipose tissue?** *Medicine*, 100 (8), 24677. <https://doi.org/10.1097/md.00000000000024677>
- Nascimento, O. V. do, & Almeida , S. C. de . (2022). **Estresse Oxidativo E Sinalizadores Inflamatórios Como Marcadores Do Quadro De Obesidade: Uma Breve Revisão Narrativa.** *Recima21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218*, 3(8), e381746. <https://doi.org/10.47820/recima21.v3i8.1746>
- Negrin KA, Roth Flach RJ, DiStefano MT, Matevossian A, Friedline RH, Jung D, Kim JK, Czech MP. **IL-1 signaling in obesity-induced hepatic lipogenesis and steatosis.** *PLoS One*. 2014 Sep 12;9(9):e107265. doi: 10.1371/journal.pone.0107265.

- Nelson, David L.; Cox, Michael M. **Hormonal regulation and integration of mammalian metabolism.** Princípios de bioquímica de Lehninger. Porto Alegre: Artmed, 2011. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- Pedroza A, Ferreira DS, Santana DF, da Silva PT, Aguiar Júnior FCA, Sellitti DF, Lagranha CJ. (2018). **Both Maternal Low-Protein and Neonatal Overnutrition Result in Similar Changes to Glomerular Morphology and Renal Cortical Oxidative Stress Measures in Male Wistar Rats.** Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism. doi:10.1139/apnm-2018-0288
- Oikonomou, E. K.; Antoniadou, C. **The role of adipose tissue in cardiovascular health and disease.** Nat Rev Cardiol, 16, n. 2, p. 83-99, Feb 2019.
- Olajide OJ, Yawson EO, Gbadamosi IT, Arogundade TT, Lambe E, Obasi K, Lawal IT, Ibrahim A, Ogunrinola KY. **Ascorbic acid ameliorates behavioural deficits and neuropathological alterations in rat model of Alzheimer's disease.** Environ Toxicol Pharmacol. 2017 Mar;50:200-211. doi: 10.1016/j.etap.2017.02.010.
- Pauli, J. R., Cintra, D. E., Souza, C. T. de ., & Ropelle, E. R.. (2009). **Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético.** Arquivos Brasileiros De Endocrinologia & Metabologia, 53(4), 399–408. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000400003>
- Park SY, Gautier JF, Chon S. **Assessment of Insulin Secretion and Insulin Resistance in Human.** Diabetes Metab J. 2021 Sep;45(5):641-654. doi: 10.4093/dmj.2021.0220. Epub 2021 Sep 30.
- Pavanello A, Martins IP, Tófolo LP, Previante C, Matusso CCI, Francisco FA, Prates KV, Alves VS, de Almeida DL, Ribeiro TA, Malta A, Mathias PCF. **Fecal Microbiota Transplantation During Lactation Programs the Metabolism of Adult Wistar Rats in a Sex-specific Way.** Arch Med Res. 2022 Jul;53(5):492-500. doi: 10.1016/j.arcmed.2022.06.007.
- Pereyra AS, Lin CT, Sanchez DM, Laskin J, Spangenburg EE, Neuffer PD, Fisher-Wellman K, Ellis JM. **Skeletal muscle undergoes fiber type metabolic switch without myosin heavy chain switch in response to defective fatty acid oxidation.** Mol Metab. 2022 May;59:101456. doi: 10.1016/j.molmet.2022.101456. .
- Pérez-Torres I, Castrejón-Téllez V, Soto ME, Rubio-Ruiz ME, Manzano-Pech L, Guarner-Lans V. **Oxidative Stress, Plant Natural Antioxidants, and Obesity.** Int J Mol Sci. 2021 Feb 11;22(4):1786. doi: 10.3390/ijms22041786.
- Pinho-Ribeiro FA, Hohmann MSN, Borghi SM, Zarpelon AC, Guazelli CFS, Manchope MF, et al. **Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF-κB.** Chem Biol Interact 2015;228:88–99. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.01.011>.
- Plagemann A, Heidrich I, Gotz F, Rohde W, and Dorner G. 1992. **Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding.** Exp. Clin. Endocrinol. 99: 154-8. doi:10.1055/s-0029-1211159.
- Powers, Scott K. **Fisiologia do exercício: teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho.** Scott K. Powers/ Edward T. Howley; — 5.ed.—Barueri: Manole 2005.
- Prajapati P, Kumar A, Singh J, Saraf SA, Kushwaha S. **Azilsartan Ameliorates Skeletal Muscle Wasting in High Fat Diet (HFD)-induced Sarcopenic Obesity in Rats via Activating Akt Signalling Pathway.** Arch Gerontol Geriatr. 2023 Sep;112:105025. doi: 10.1016/j.archger.2023.105025.
- Qaisar R, Bhaskaran S, Van Remmen H. **Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration.** Free Radic Biol Med. 2016 Sep;98:56-67. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.03.025.
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K., 2007. **Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method.** Nat. Protoc. 1, 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>

- Reichl, B; Eichelberg, N; Freytag, M; Gojo, J; Peyrl, A; Buchberger, W. **Evaluation and optimization of common lipid extraction methods in cerebrospinal fluid samples.** Journal of Chromatography B. 1153 (2020).
- Ribeiro TA, Pavanello A, Tófolo LP, de Oliveira JC, Moraes AMP, Franco CCDS, Prates KV, Martins IP, Palma-Rigo K, Torrezan R, Yeo E, Gomes RM, Francisco FA, Mathias PCF, Malta A. **Soy isoflavones recover pancreatic islet function and prevent metabolic dysfunction in male rats.** J Endocrinol. 2021 Jul 7;250(3):81-91. doi: 10.1530/JOE-21-0019.
- Ross D, Moldeus P. **Antioxidant defense systems and oxidative stress.** In: **Vigo-Pelfrey C. Membran e lipid oxidation.** Boca Raton: CRC; 1991. p.151-70.
- Salans, L. B., Knittle, J. L. & Hirsch, J. **The role of adipose cell size and adipose tissue insulin sensitivity in the carbohydrate intolerance of human obesity.** J. Clin. Invest. 47, 153–165 (1968).
- Santos RD. **III Diretriz Brasileira sobre Dislipidemias e Diretriz sobre Prevenção de Aterosclerose do Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia.** Arq Bras Cardiol. 2001;77(Suppl 3):1-48.
- Santos, F. M. M. (2017). **Obesidade e estado inflamatório: principais adipocinas envolvidas.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul-LUME-Repositório Digital, 1-28.
- Sattar N., Forrest E., Preiss D. **Non-alcoholic fatty liver disease.** BMJ. 2014;349:8. doi: 10.1136/bmj.g4596.
- Savage, D.B., Petersen, K.F., & Shulman, G.I. (2007) **Disordered lipid metabolism and the pathogenesis of insulin resistance.** Physiol.Rev. 87, 507–520.
- Schaubroeck, KJ; Leitner, BP; Perry, RJ. **An optimized method for tissue glycogen quantification.** Physiological Reports. 2022. doi: 10.14814/phy2.15195
- Schiaffino S, Reggiani C. **Fiber types in mammalian skeletal muscles.** Physiol Rev. 2011 Oct;91(4):1447-531. doi: 10.1152/physrev.00031.2010.
- Schiaffino S, Reggiani C, Akimoto T, Blaauw B. **Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Hypertrophy.** J Neuromuscul Dis. 2021;8(2):169-183. doi: 10.3233/JND-200568.
- Semple, R.K., Chatterjee, V.K.K., & O’Rahilly, S. (2006) **PPAR $\gamma$  and human metabolic disease.** J. Clin. Invest. 116, 581–589.
- Senthilkumar M, Amaesan N, Sankaranarayanan A, 2021. **Plant-Microbe Interactions, Springer Protocols Handbooks.** Springer US, New York, NY. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1080-0>
- Seo YJ, Kim KJ, Choi J, Koh EJ, Lee BY. **Spirulina maxima Extract Reduces Obesity through Suppression of Adipogenesis and Activation of Browning in 3T3-L1 Cells and High-Fat Diet-Induced Obese Mice.** Nutrients. 2018 Jun 1;10(6):712. doi: 10.3390/nu10060712.
- Sharma, A.M. & Staels, B. (2007) **Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  and adipose tissue—understanding obesity related changes in regulation of lipid and glucose metabolism.** J. Clin.Endocrinol. Metab. 92, 386–395
- Shao, M., Vishvanath, L., Busbuso, N.C., Hepler, C., Shan, B., Sharma, A.X., Chen, S., Yu, X., An, Y.A., Zhu, Y., et al. (2018). **De novo adipocyte differentiation from Pdgfr $\beta$ + preadipocytes protects against pathologic visceral adipose expansion in obesity.** Nat. Commun. 9, 890.
- Shulman GI. Cellular mechanisms of insulin resistance. J Clin Invest 2000;106:171–176
- Siervo GEML, Vieira HR, Ogo FM, Fernandez CDB, Gonçalves GD, Mesquita SFP, Fernandes GSA. (2015). **Spermatic and testicular damages in rats exposed to ethanol: Influence of lipid peroxidation but not testosterone.** Toxicology, 330, 1–8. doi:10.1016/j.tox.2015.01.016
- Silva, D. M. L., Joaquinho, A. de P., Daniel, N. V. S., Ananias, F., Oliveira, C. R. de A., Marques, R. E. F. de A., & Picoli, M. E. F. da S. (2021). **Participação de HIF-1 $\alpha$  na resistência insulínica induzida por obesidade / Participation of HIF-1 $\alpha$  in insulin resistance obesity-induced.** Brazilian Journal of Development, 7(8), 78341–78357. <https://doi.org/10.34117/bjdv7n8-179>
- Silva P, Ribeiro TA, Tófolo LP, Prates KV, Francisco FA, Silveira SDS, Malta A, Lopes DA, Miranda RA, Palma-Rigo K, Torrezan R, Mathias PCF. **Treatment with soy isoflavones during early**

- adulthood improves metabolism in early postnatally overfed rats.** *Nutr Neurosci.* 2018 Jan;21(1):25-32. doi: 10.1080/1028415X.2016.1213007.
- Simoneau JA, Veerkamp JH, Turcotte LP, et al. **Markers of capacity to utilize fatty acids in human skeletal muscle: relation to insulin resistance and obesity and effects of weight loss.** *FASEB J* 1999;13:2051–2060.
- Sippel, CA; Bastian, RMA; Giovanella, J; Faccin, C; Contini, V; Dal Bosco, SM. **Processos Inflamatórios Da Obesidade.** v. 12 n. 42 (2014): Revista de Atenção à Saúde. DOI: <https://doi.org/10.13037/rbcs.vol12n42.2310>
- Sivanathan, S. et al. **Chronic high fat feeding increases anxiety-like behaviour and reduces transcript abundance of glucocorticoid signalling genes in the hippocampus of female rats.** *Behav Brain Res*, v. 286, p. 265-270, 2015.
- Skurk, T., Alberti-Huber, C., Herder, C. & Hauner, H. **Relationship between adipocyte size and adipokine expression and secretion.** *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92, 1023–1033 (2007).
- Stopa LRS, de Souza CF, Martins AB, Lopes GM, Costa NO, Gerardin DCC, de Carvalho GG, Zaia DAM, Zaia CTBV, Uchoa ET, Leite CM. **Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats.** *Mol Cell Endocrinol.* 2021. doi: 10.1016/j.mce.2020.111147.
- Symonds, M. E. **Adipose tissue biology.** Springer, 2012.
- Sociedade Brasileira de Cardiologia. **Diretrizes Brasileiras Sobre Dislipidemias e Diretrizes de Prevenção da aterosclerose.** *Arq. Bras. Cardiol.* v.77, supl. III p.1-48, 2001.
- Souza LL, Moura EG, Lisboa PC. **Litter Size Reduction as a Model of Overfeeding during Lactation and Its Consequences for the Development of Metabolic Diseases in the Offspring.** *Nutrients.* 2022 May 13;14(10):2045. doi: 10.3390/nu14102045.
- Sun, K. et al. **Dichotomous effects of VEGF-A on adipose tissue dysfunction.** *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 5874–5879 (2012).
- Takagi H, Ikehara T, Hashimoto K, Tanimoto K, Shimazaki A, Kashiwagi Y, Sakamoto S, Yukioka H. **Acetyl-CoA carboxylase 2 inhibition reduces skeletal muscle bioactive lipid content and attenuates progression of type 2 diabetes in Zucker diabetic fatty rats.** *Eur J Pharmacol.* 2021 Nov 5;910:174451. doi: 10.1016/j.ejphar.2021.174451.
- Tranberg B, Hellgren LI, Lykkesfeldt J, Hansen AK. **High-fat feeding induces mobilization of vitamin C in obese prone rats.** *Res Vet Sci.* 2018 Aug;119:167-169. doi: 10.1016/j.rvsc.2018.06.011.
- Tseng, Y.H.; Kokkotou, E.; Schulz, T.J.; Huang, T.L.; Winnay, J.N.; Taniguchi, C.M.; Tran, T.T.; Suzuki, R.; Espinoza, D.O.; Yamamoto, Y.; et al. **New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure.** *Nature* 2008, 454, 1000–1004.
- Van Handel, E. **Microseparation of Glycogen, Sugars and Lipids.** *Analytical Biochemistry.* 11, 266-271 (1965).
- Vasconcelos AR, Yshii LM, Viel TA, Buck HS, Mattson MP, Scavone C, et al. **Intermittent fasting attenuates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and memory impairment.** *J Neuroinflammation.* May 6;11(1):85. 2014.
- Vinayagamoorathi, R.; Bobby, Z.; Sridhar, M. G. **Antioxidants preserve redox balance and inhibit c-Jun-N-terminal kinase pathway while improving insulin signaling in fat-fed rats: evidence for the role of oxidative stress on IRS-1 serine phosphorylation and insulin resistance.** *The Journal of endocrinology* 197:287-296; 2008.
- Wang, Q., Tao, C., Gupta, R. et al. **Tracking adipogenesis during white adipose tissue development, expansion and regeneration.** *Nat Med* 19, 1338–1344. 2013. <https://doi.org/10.1038/nm.3324>
- Warneke, W. et al. **The impact of cafeteria diet feeding on physiology and anxiety-related behaviour in male and female Sprague-Dawley rats of different ages.** *Pharmacol Biochem Behav*, v. 116, p. 45-54, 2014.

- Wong-Ekkabut, Z. J. Xu, W. Triampo, I.M. Tang, D.P. Tieleman, L. Monticelli. **Effect of lipid peroxidation on the properties of lipid bilayers: a molecular dynamics study.** Biophys. J. 93, 4225e4236. 2007.
- Wunderlich ALM, Martins AB, de Souza CF, Stopa LRS, Monteiro ÉCAM, Aguiar DD, Guergolette RP, Zaia CTBV, Uchôa ET. **Neonatal overnutrition, but not neonatal undernutrition, disrupts CCK-induced hypophagia and neuron activation of the nucleus of the solitary tract and paraventricular nucleus of hypothalamus of male Wistar rats.** Brain Res Bull. 2023 Apr;195:109-119. doi: 10.1016/j.brainresbull.2023.02.012.
- Xavier, H. T. et al. **V Diretriz Brasileira de Dislipidemias e Prevenção da Aterosclerose.** Arq. Bras. Cardiol., São Paulo, v. 101, n. 4, supl. 1, p. 1- 20, Oct. 2013. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.2013S010>
- Zhao, G.-N., Tian, Z.-W., Tian, T., Zhu, Z.-P., Zhao, W.-J., Tian, H., Li, H. **TMBIM1 is an inhibitor of adipogenesis and its depletion promotes adipocyte hyperplasia and improves obesity-related metabolic disease.** Cell Metabolism, 33(8), 1640–1654.e8, 2021. doi:10.1016/j.cmet.2021.05.01410.1016/j.cmet.2021.05.014
- Zimmerman R, Strauss JG, Haemmerle G et al. **Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase.** Science, 306:13836, 2004.
- Zielinska-Blizniewska, H.; Sitarek, P.; Merecz-Sadowska, A.; Malinowska, K.; Zajdel, K.; Jabłonska, M.R.; Sliwinski, T.; Zajdel, R. **Plant Extracts and Reactive Oxygen Species as Two Counteracting Agents with Anti- and Pro-Obesity Properties.** Int. J. Mol. Sci. 20, 4556, 2019.

## ANEXO



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

## 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/Uel), 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 heterogêneo / Wistar                                                                                                                                                                                        |
| Nº de animais              | <b>Matrizes: 80 machos e 60 fêmeas oriundos do Biotério Central do CCB</b><br>Prole estimada - 1ª geração: 300 machos e 300 fêmeas<br>Prole estimada - 2ª geração: 100 machos e 100 fêmeas<br>Total: 940 animais |
| Peso/ Idade                | Matrizes adultas: 210-230g<br>Prole estimada - 1ª geração: 60 a 90 dias<br>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                                                                                                                                                         |

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

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

Profª. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
Coordenadora da CEUA/Uel

**Profª. Dra. Maria Fernanda  
Rodrigues Graciano**  
Coordenadora da Comissão de  
Ética no Uso de Animais  
Universidade Estadual de Londrina  
rua Uel, 18 / (43) 3371-5454

Ilmo.(a) Sr.(a)

**Prof. (a) Dr. 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