



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

RHAUANY PELISSON GUERGOLETTE BARROS

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C NO PERÍODO PERIPUBERAL: EFEITOS
SOBRE A HOMEOSTASE ENERGÉTICA DE RATOS ADULTOS COM
SUPERNUTRIÇÃO LACTACIONAL INDUZIDA POR REDUÇÃO DE NINHADA**

Londrina
2026

RHAUANY PELISSON GUERGOLETTE BARROS

**SUPLEMENTAÇÃO COM VITAMINA C NO PERÍODO PERIPUBERAL: EFEITOS
SOBRE A HOMEOSTASE ENERGÉTICA DE RATOS ADULTOS COM
SUPERNUTRIÇÃO LACTACIONAL INDUZIDA POR REDUÇÃO DE 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

2026

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Guergolette, Rhauany Pelisson .

Suplementação com vitamina C no período peripuberal: efeitos sobre a homeostase energética de ratos adultos com supernutrição lactacional induzida por redução de ninhada / Rhauany Pelisson Guergolette. - Londrina, 2026.

128 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, 2026.

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Cristiane Mota Leite
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Flaviane de Fátima Silva
University of Massachusetts Chan Medical School - UMass Chan

Profa. Dra. Gisele Lopes Bertolini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Patrícia Chimin Perandini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dedico este trabalho aos meus pais, Aparecido e Cinira, aos meus irmãos, Ágatha e Rodrigo; e ao meu esposo e maior incentivador desde que entrou em minha vida: Evandro.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, minha gratidão a Deus, por todas as bênçãos que Ele realizou em minha vida, pois todas elas me permitiram chegar até aqui, e eu vejo o cuidado dEle em cada detalhe da minha história. Minha eterna gratidão ao meu orientador, professor Dr. Ernane, por ter me recebido no laboratório, por ter confiado em mim e por todos os ensinamentos (foram incontáveis, de verdade). Saiba que você foi um ótimo orientador, professor e amigo, e tem toda a minha admiração. Agradeço de coração à professora Dra. Thaís Zaia, que, juntamente com o professor Ernane, me recebeu com tanto carinho em seu laboratório; eu cresci muito com você. Agradeço à professora Dra. Glaura Fernandes, ao professor Dr. Fábio Goulart e ao professor Dr. Waldiceu Verri, por abrirem as portas de seus laboratórios e contribuírem com este trabalho.

Agradeço pela intercessão de Nossa Senhora e São José, que, como pais, intercedem pelo meu caminho desde o meu nascimento, quando fui colocada, ainda no hospital, no colo dos melhores pais que Deus poderia me conceder: Aparecido e Cinira. Vocês dizem que, quando me pegaram no colo, sentiram em meu olhar o pedido para que cuidassem de mim... Mas eu SEI que foi Deus, com a intercessão de Seus pais. Este trabalho é o reflexo do meu reconhecimento por tudo que fizeram e fazem por mim e meus irmãos. Agradeço também a eles, Ágatha e Rodrigo, por tudo. Vocês sempre terem acreditado em mim foi uma das minhas maiores motivações. Ao meu esposo, Evandro, que, ainda no namoro, tantas vezes aos domingos e feriados esteve comigo no laboratório para que eu não fosse sozinha, e que agora, como marido, é minha fortaleza sempre que me sinto frágil: obrigada por todo apoio, respeito e amor. Agradeço aos meus afilhados e sobrinhos, meu coração fora do peito: Beatriz, Benízio, Valentin, José Antônio, Ana Laura, Alice, Nicolas e Dominic. Grata a todos os meus amigos pessoais que, em todos esses anos, foram compreensivos e, acima de tudo, acreditaram e torceram por mim e por este trabalho.

Sempre digo que ciência não se faz sozinha, e este trabalho também tem as mãos de vocês: Camila Souza, Ana Luiza Wunderlich, Danielly Aguiar, Júlia Bandeira, Fabiano Tsutsui, Polyana Shishido e todos os demais amigos da UEL. À minha sócia/irmã de alma, Larissa Stopa, que, além de ter me apresentado ao laboratório, me ajuda desde 2019 a crescer como mulher, biomédica e pesquisadora. Aos meus pacientes, por toda compreensão ao longo destes anos. Agradeço o suporte dos técnicos Afonso Saiz, Fujiko Morinaga e Wagner Risso. Finalmente, grata ao Programa de Ciências Fisiológicas, à coordenadora, professora Dra. Graziela Ceravolo, aos professores do PPG que fizeram parte da minha caminhada acadêmica e aos órgãos de fomento CAPES e CNPq, pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.

GUERGOLETTE, Rhauany Pelisson. **Suplementação com vitamina C no período peripuberal: efeitos sobre a homeostase energética de ratos adultos com supernutrição lactacional induzida por redução de ninhada**. 2026, 129f. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2026.

Resumo

O período inicial da vida é um momento crítico de plasticidade neuroendócrina, no qual o organismo é particularmente suscetível à programação metabólica. A obesidade associa-se a estresse oxidativo (EO) e inflamação crônica de baixo grau, havendo evidências de que antioxidantes como a vitamina C (vitC) podem atenuar essas repercussões. Este estudo avaliou, em ratos Wistar com supernutrição lactacional (NL: ninhada normal; SL: ninhada reduzida), os efeitos metabólicos, redox e inflamatórios da supernutrição neonatal e da suplementação com vitC durante a puberdade. Os animais receberam vitC (50 mg/dia, gavagem) ou veículo (água) do DPN 30 ao 59 (grupos NL-v, NL-vitC, SL-v, SL-vitC), sendo avaliados no DPN 60 e no DPN 90. No DPN 60, os animais SL apresentaram maior ganho de peso, adiposidade, intolerância à glicose e acúmulo lipídico hepático e no músculo gastrocnêmio (MG). O estado redox mostrou-se comprometido de forma tecido-específica: peroxidação lipídica no fígado, aumento de EROs com ativação compensatória das defesas antioxidantes no MG, e redução precoce de GSH sem alteração pró-oxidante no músculo sóleo (MS). A vitC favoreceu o crescimento nos NL, melhorou a tolerância à glicose apenas nos SL, com efeitos redox variáveis conforme o tecido. No DPN 90, o comprometimento metabólico persistiu e se agravou, com indícios de resistência insulínica e desequilíbrio redox mais evidentes. A vitC, tardiamente, reduziu o ganho de peso, a adiposidade e a intolerância à glicose em ambos os grupos, além de atenuar parcialmente o acúmulo lipídico e o dano oxidativo no fígado e no MG. Os resultados demonstram que a supernutrição neonatal promove um fenótipo de obesidade e disfunção metabólica persistente, e que a vitC na puberdade atenuou, de forma tecido- e tempo-dependente, os desequilíbrios metabólicos, redox e inflamatórios da programação neonatal, reforçando a puberdade como janela importante para intervenções contra a obesidade precoce.

Palavras-chave: Supernutrição lactacional. Vitamina C. Puberdade. Músculo esquelético. Fígado.

GUERGOLETTE, Rhauany Pelisson. **Peripubertal vitamin C supplementation: effects on energy homeostasis in adult rats with litter size reduction-induced lactational overnutrition**. 2026, 129f. Thesis (Doctorate in Physiological Sciences) – State University of Londrina, Londrina, 2026.

Abstract

The early stages of life represent a critical period of neuroendocrine plasticity, during which the organism is particularly susceptible to metabolic programming. Obesity is associated with oxidative stress (OS) and low-grade chronic inflammation, and evidence suggests that antioxidants such as vitamin C (vitC) may attenuate these repercussions. This study evaluated, in Wistar rats subjected to lactational overnutrition (litter size reduction; NL: *normal litter*; SL: *small litter*), the metabolic, redox and inflammatory effects of neonatal overnutrition and vitC supplementation during puberty. Animals received vitC (50 mg/day/rat, gavage) or vehicle (tap water) from postnatal day (PND) 30 to 59 (NL-vehicle, NL-vitC, SL-vehicle and SL-vitC groups), and were evaluated at PND 60 and PND 90. At PND 60, SL animals showed greater body weight gain, adiposity, glucose intolerance, and increased lipid accumulation in the liver and gastrocnemius muscle (GM). Redox status was compromised in a tissue-specific manner: lipid peroxidation in the liver, increased ROS production with compensatory antioxidant activation in the GM and an early reduction in GSH without pro-oxidant changes in the soleus muscle (SM). VitC promoted growth in NL animals, improved glucose tolerance exclusively in SL animals, with redox effects that varied by tissue. At PND 90, metabolic impairment persisted and worsened, with evidence of insulin resistance and more pronounced redox imbalance. VitC reduced body weight gain, adiposity and glucose intolerance in both groups, and partially attenuated lipid accumulation and oxidative damage in the liver and GM. These findings demonstrate that neonatal overnutrition induces a persistent phenotype of obesity and metabolic dysfunction, and that vitC supplementation during puberty attenuated, in a tissue- and time-dependent manner, the metabolic, redox and inflammatory imbalances resulting from neonatal programming, reinforcing puberty as an important window for interventions targeting early-onset obesity.

Keywords: Lactational overnutrition. Vitamin C. Puberty. Skeletal muscle. Liver.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Delineamento experimental.....	36
Figura 2: Perfil morfométrico.....	47
Figura 3: Índice de Lee e adiposidade.....	48
Figura 4: Perfil glicêmico	49
Figura 5: Índices de sensibilidade à insulina.....	50
Figura 6: Perfil lipídico plasmático.....	51
Figura 7: Metabolismo lipídico hepático.....	54
Figura 8: Metabolismo glicídico hepático.....	55
Figura 9: Infiltração inflamatória hepática.....	56
Figura 10: Marcadores pró-oxidantes hepáticos.....	57
Figura 11: Defesas antioxidantes hepáticas.....	58
Figura 12: Capacidade antioxidante hepática.....	59
Figura 13: Massa relativa: músculo gastrocnêmio.....	61
Figura 14: Metabolismo lipídico: músculo gastrocnêmio.....	62
Figura 15: Metabolismo glicídico: músculo gastrocnêmio.....	63
Figura 16: Infiltração inflamatória: músculo gastrocnêmio.....	64
Figura 17: Marcadores pró-oxidantes: músculo gastrocnêmio.....	65
Figura 18: Defesas antioxidantes: músculo gastrocnêmio.....	66
Figura 19: Capacidade antioxidante: músculo gastrocnêmio.....	67
Figura 20: Massa relativa: músculo sóleo.....	69
Figura 21: Metabolismo lipídico: músculo sóleo.....	70
Figura 22: Metabolismo glicídico: músculo sóleo.....	71
Figura 23: Infiltração inflamatória do músculo sóleo.....	72
Figura 24: Marcadores pró-oxidantes do músculo sóleo.....	73
Figura 25: Defesas antioxidantes do músculo sóleo.....	74
Figura 26: Capacidade antioxidante do músculo sóleo.....	75

Figura 27. Síntese das principais alterações do perfil metabólico sistêmico.....	78
Figura 28. Síntese das principais alterações hepáticas.....	85
Figura 29. Síntese das principais alterações no músculo gastrocnêmio.....	94
Figura 30. Síntese das principais alterações no músculo sóleo.....	104

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição estatística do perfil morfofisiológico, homeostase glicêmica, sensibilidade à insulina e perfil lipídico plasmático.....	52
Tabela 2. Descrição estatística do metabolismo tecidual, infiltração inflamatória, marcadores pró-oxidativos e defesas antioxidantes: Fígado.....	60
Tabela 3. Descrição estatística do metabolismo tecidual, infiltração inflamatória, marcadores pró-oxidativos e defesas antioxidantes: músculo Gastrocnêmio.....	68
Tabela 4. Descrição estatística do metabolismo tecidual, infiltração inflamatória, marcadores pró-oxidativos e defesas antioxidantes: músculo Sóleo.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS: Ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ACOX: Acil-CoA oxidase
Akt: Proteína quinase B
AMPK: Proteína quinase ativada por AMP
ANOVA: Análise de variância
ATP: Adenosina trifosfato
AUC: Área sob a curva (*Area Under the Curve*)
BMI: Índice de massa corporal (*Body Mass Index*)
BSA: Albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin*)
CAT: Catalase
CCL2/MCP-1: Proteína quimioatraente de monócitos 1
CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais
CPT-1: Carnitina palmitoiltransferase 1
DAG: Diacilglicerol
DMSO: Dimetilsulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DOHaD: Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (*Developmental Origins of Health and Disease*)
DPN: Dia pós-natal
DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA: Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
EO: Estresse oxidativo
EPM: Erro padrão da média
ERNs: Espécies reativas de nitrogênio
EROs: Espécies reativas de oxigênio
FRAP: Poder antioxidante redutor do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)
GBD: *Global Burden of Disease*
GENLIN: Modelos Lineares Generalizados (*Generalized Linear Models*)
GLUT2: Transportador de glicose do tipo 2
GLUT4: Transportador de glicose do tipo 4
GSH: Glutathiona reduzida
GTT: Teste de tolerância à glicose (*Glucose Tolerance Test*)
HDL: Lipoproteína de alta densidade (*High-Density Lipoprotein*)
HOCl: Ácido hipocloroso
HOMA- β : Modelo de avaliação da homeostase da função das células β (*Homeostasis Model Assessment of β -cell Function*)
HOMA-IR: Modelo de avaliação da homeostase da resistência à insulina (*Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance*)
HTAB: Brometo de hexadeciltrimetilamônio
H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-6: Interleucina-6
IRS-1: Substrato do receptor de insulina 1 (*Insulin Receptor Substrate 1*)
IκK: Quinase do IκB (*IκB kinase*)
LDL: Lipoproteína de baixa densidade (*Low-Density Lipoprotein*)
LDLR: Receptor de LDL
MDA: Malondialdeído
ME: Músculo Esquelético
MG: Músculo Gastrocnêmio
MS: Músculo Sóleo
MPO: Mieloperoxidase
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NAG: N-acetil-β-D-glicosaminidase
NBT: Nitroblue tetrazolium (Nitroazul de tetrazólio)
NF-κB: Fator nuclear kappa B
NL: Ninhada normal (*Normal litter*)
PBS: Tampão fosfato-salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
PCO: Carbonilação proteica (*Protein carbonyls*)
PCSK9: Pró-proteína convertase subtilisina/kexina tipo 9
PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinase
PKCθ: Proteína quinase C teta
PPARα: Receptor ativado por proliferadores de peroxissomo alfa (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha*)
SCD1: Estearoil-CoA dessaturase 1
SL: Ninhada reduzida (*Small litter*)
SOD: Superóxido dismutase
SREBP-1c: Proteína de ligação ao elemento regulador de esteroide 1c (*Sterol Regulatory Element-Binding Protein 1c*)
SVCT2: Transportador de vitamina C dependente de sódio 2 (*Sodium-dependent Vitamin C Transporter 2*)
TAE: Tecido adiposo epididimal
TAR: Tecido adiposo retroperitoneal
TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
TPTZ: 2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina
TyG: Índice triglicerídeos-glicose (*Triglyceride–Glucose Index*)
UEL: Universidade Estadual de Londrina
VLCAD: Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa (*Very Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenase*)
VLDL: Lipoproteína de muito baixa densidade (*Very Low-Density Lipoprotein*)
VitC: Vitamina C.

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Obesidade infantil e Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença...	17
1.2 Redução de ninhada: modelo experimental de supernutrição neonatal.....	18
1.3 Puberdade como janela de plasticidade metabólica.....	20
1.4 Homeostase energética: Integração entre fígado e músculo esquelético.....	20
1.4.1 Fígado.....	21
1.4.2 Músculo esquelético.....	24
1.5 Estresse oxidativo e inflamação associados à obesidade.....	27
1.6 Vitamina C como estratégia terapêutica.....	29
2.JUSTIFICATIVA.....	32
3.OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivos gerais.....	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1 Animais.....	33
4.2 Tratamento.....	34
4.3 Delineamento experimental.....	34
4.3.1 Avaliação dos efeitos da suplementação com vitamina C durante o período peripuberal sobre as alterações induzidas pela supernutrição neonatal em ratos Wistar.....	35
4.4 Perfil morfofisiológico.....	36
4.4.1 Aferição do peso corporal.....	36
4.4.2 Cálculo da ingestão alimentar.....	36
4.4.3 Determinação da eficiência energética.....	37
4.4.4 Determinação do índice de Lee.....	37
4.4.5 Determinação do peso dos tecidos adiposos viscerais.....	37
4.4.6 Determinação do peso dos músculos gastrocnêmio e sóleo.....	38
4.5 Determinação das concentrações plasmáticas de lipídios.....	38
4.5.1 Determinação das concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis.....	38
4.6 AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE GLICÊMICA.....	38
4.6.1 Determinação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina.....	38

4.6.2 Teste de tolerância à glicose (GTT).....	39
4.6.3 Determinação do índice HOMA-IR.....	39
4.6.4 Determinação do índice TyG.....	39
4.7 CONCENTRAÇÕES TECIDUAIS DE METABÓLITOS ENERGÉTICOS.....	40
4.7.1 Determinação da concentração tecidual de glicose.....	40
4.7.2 Determinação da concentração tecidual de glicogênio.....	40
4.7.3 Determinação das concentrações teciduais de colesterol e triacilgliceróis..	41
4.8 AVALIAÇÃO DA HOMEOSTASE REDOX.....	41
4.8.1 Determinação da peroxidação lipídica (ensaio TBARS).....	42
4.8.2 Determinação da carbonilação proteica.....	42
4.8.3 Determinação da produção de ânion superóxido (NBT).....	42
4.8.4 Determinação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH).....	43
4.8.5 Determinação da atividade da catalase (CAT).....	43
4.8.6 Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD).....	43
4.8.7 Determinação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP).....	43
4.8.8 Determinação da capacidade antioxidante total (ABTS).....	44
4.9 AVALIAÇÃO DA INFILTRAÇÃO DE CÉLULAS INFLAMATÓRIAS.....	44
4.9.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).....	44
4.9.2 Determinação da atividade da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG).....	45
4. 10 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
5. RESULTADOS.....	46
5.1 Resultados referentes aos dois protocolos, DPN 60 e DPN 90.....	46
5.1.1 Avaliação morfofisiológica.....	46
5.1.2 Avaliação da homeostase glicêmica.....	48
5.1.3 Avaliação do perfil lipídico.....	50
5.2 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO TECIDUAL, HOMEOSTASE REDOX E INFILTRAÇÃO INFLAMATÓRIA: FÍGADO.....	53
5.2.1 Metabolismo hepático.....	53
5.2.2 Infiltração inflamatória hepática.....	55
5.2.3 Marcadores pró-oxidativos no fígado.....	56
5.2.4 Avaliação de defesas antioxidantes hepáticas.....	57
5.3 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO TECIDUAL, HOMEOSTASE REDOX E INFILTRAÇÃO INFLAMATÓRIA: MÚSCULO GASTROCNÊMIO.....	61
5.3.1 Metabolismo do gastrocnêmio.....	61

5.3.2 Infiltração inflamatória.....	64
5.3.3 Marcadores pró-oxidativos.....	65
5.3.4 Avaliação das defesas antioxidantes.....	66
5.4 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO TECIDUAL, HOMEOSTASE REDOX E INFILTRAÇÃO INFLAMATÓRIA: MÚSCULO SÓLEO.....	69
5.4.1 Metabolismo tecidual.....	69
5.4.2 Infiltração inflamatória.....	72
5.4.3 Marcadores pró-oxidativos.....	73
5.4.4 Avaliação das defesas antioxidantes.....	74
6. DISCUSSÃO.....	77
7. CONCLUSÕES.....	114
REFERÊNCIAS.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 Obesidade infantil e as origens desenvolvimentistas da saúde e da doença

As projeções epidemiológicas recentes apontam que a obesidade continuará a crescer de forma acelerada nas próximas décadas. Segundo estimativas do estudo Global Burden of Disease (GBD 2021 Adolescent BMI Collaborators, 2025), aproximadamente um terço das crianças e dos jovens em todo o mundo apresentará excesso de peso ou obesidade até 2050. Diante desse cenário, a obesidade infantil configura-se como um dos principais desafios de saúde pública da atualidade, não apenas por sua elevada prevalência, mas também por estar associada à maior probabilidade de persistência da doença na vida adulta e ao desenvolvimento precoce de complicações metabólicas. Dessa forma, elucidar os processos biológicos envolvidos na fisiopatologia da obesidade desde os estágios iniciais da vida, bem como aqueles relacionados à sua progressão, é fundamental para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção e tratamento (Organização Mundial da Saúde, 2025).

A etiologia da obesidade é complexa e multifatorial, resultando da interação entre fatores biológicos e ambientais (Bluher, 2019; Organização Mundial da Saúde, 2025). Nas últimas décadas, evidências científicas demonstraram que exposições ocorridas durante o período inicial da vida podem exercer efeitos duradouros sobre a estrutura e a função de diferentes órgãos e sistemas, influenciando a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (Hanson & Gluckman, 2014; Fleming et al., 2018). Esses achados estabeleceram as bases do conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (Developmental Origins of Health and Disease - DOHaD), inicialmente proposto a partir dos estudos pioneiros de David Barker, que possibilitaram compreender que condições ambientais e nutricionais no início da vida podem modificar a trajetória da saúde metabólica, influenciando também a predisposição ao desenvolvimento de doenças ao longo da vida (Barker, 2004; Heindel et al., 2015; Rosenfeld, 2020). Nesse contexto, as pesquisas passaram a investigar as características biológicas que tornam determinadas fases no período inicial da vida particularmente mais suscetíveis aos estímulos ambientais e nutricionais.

O início da vida é caracterizado por elevada plasticidade biológica, período em que órgãos e sistemas ainda se encontram em intensa formação,

crescimento e maturação funcional (Hanson & Gluckman, 2014; Fleming et al., 2018). Essa plasticidade confere ao organismo notável capacidade adaptativa frente às condições do ambiente, favorecendo ajustes estruturais, fisiológicos e metabólicos necessários ao desenvolvimento e à sobrevivência (Hoffman & Barrett, 2021). Em contrapartida, a elevada responsividade característica dessa fase também aumenta sua vulnerabilidade às alterações do estado nutricional, fazendo da nutrição um dos principais moduladores da programação metabólica e da saúde ao longo da vida (Heindel et al., 2015).

Dentre as diferentes janelas de plasticidade biológica, a lactação corresponde ao período de maior crescimento pós-natal, acompanhado pela maturação funcional de sistemas envolvidos na regulação da ingestão alimentar, do metabolismo energético e da homeostase endócrina (Plagemann, 2005; Vickers, 2014). Considerando isso, alterações quantitativas ou qualitativas na disponibilidade nutricional durante essa fase podem repercutir sobre esses processos maturacionais, produzindo efeitos persistentes sobre a fisiologia metabólica (Heindel et al., 2015; Fleming et al., 2018). Em razão dessa elevada sensibilidade, diferentes modelos experimentais têm sido desenvolvidos para reproduzir alterações nutricionais durante a lactação, a fim de investigar seus efeitos sobre a programação metabólica e suas repercussões a longo prazo.

1.2 Redução do tamanho da ninhada como modelo experimental de supernutrição neonatal

A supernutrição pode ser reproduzida experimentalmente por diferentes metodologias. Entre elas, a redução do tamanho da ninhada consolidou-se como um modelo de grande relevância para o estudo da programação metabólica, por mimetizar, de forma consistente, as adaptações metabólicas decorrentes do excesso de oferta nutricional durante a lactação, permitindo investigar especificamente seus efeitos em uma janela crítica do desenvolvimento, sem a necessidade de manipulações dietéticas ou genéticas (Plagemann, 2005; Boullu-Ciocca et al., 2005; Vickers, 2014). Diferentemente de outros modelos experimentais de obesidade, essa abordagem possibilita avaliar as consequências de uma alteração nutricional precoce sobre o percurso metabólico do indivíduo, reproduzindo adaptações persistentes, como obesidade, alterações endócrinas e distúrbios metabólicos que permanecem até a vida adulta (Boullu-Ciocca et al., 2005; De Souza et al., 2023).

Esse modelo baseia-se na redução do número de filhotes por ninhada logo após o nascimento, sem alteração da capacidade lactacional materna. Como consequência, a menor competição pelo leite aumenta a disponibilidade nutricional para cada filhote durante todo o período lactacional, caracterizando um estado de supernutrição neonatal (Plagemann, 2005; De Souza et al., 2023; Wunderlich et al., 2023).

Essa condição resulta não apenas em maior ingestão energética por filhote, mas evidências também sugerem que a redução do tamanho da ninhada pode modificar a composição do leite materno, incluindo aumento do teor lipídico e redução do conteúdo proteico (Yagil et al., 1976), ampliando ainda mais a exposição energética aos filhotes durante essa janela crítica do desenvolvimento (Plagemann, 2005; De Souza et al., 2023; Wunderlich et al., 2023). Dessa forma, esses fatores promovem crescimento pós-natal acelerado e desencadeiam alterações precoces em vias metabólicas e endócrinas envolvidas na regulação da homeostase energética, incluindo modificações na secreção de leptina e insulina, bem como na maturação funcional de tecidos metabolicamente ativos, como fígado, músculo esquelético e tecido adiposo, por exemplo (Plagemann, 2005; Vickers et al., 2014; Souza et al., 2022).

Além disso, os efeitos da supernutrição neonatal estendem-se para além do período lactacional. Estudos demonstram que a redução do tamanho da ninhada promove modificações duradouras na regulação do balanço energético, favorecendo o desenvolvimento de um fenótipo de obesidade e disfunções metabólicas que persistem ao longo da vida (Souza et al., 2022; Skowronski et al., 2024). Tais alterações são acompanhadas pela reprogramação dos sistemas neuroendócrino e metabólico envolvidos na homeostase energética, cujas repercussões podem ser observadas em diferentes tecidos e órgãos (Souza et al., 2022; Burton & Alonso, 2024). A capacidade desse modelo experimental de reproduzir distúrbios metabólicos de forma duradoura decorrentes exclusivamente de modificações no ambiente nutricional durante a lactação, torna-o uma ferramenta particularmente valiosa para investigar os mecanismos envolvidos na programação metabólica, avaliar suas consequências sobre diferentes sistemas fisiológicos e testar estratégias terapêuticas capazes de prevenir, atenuar ou reverter tais repercussões em diferentes momentos do desenvolvimento (Souza et al., 2022; Skowronski et al., 2024).

1.3 Puberdade como janela de plasticidade metabólica

Embora o conceito DOHaD tenha demonstrado que exposições ocorridas no início da vida exercem influência duradoura sobre a saúde metabólica, evidências mais recentes indicam que essa programação não é um processo irreversível. Determinadas fases do desenvolvimento pós-natal ainda apresentam elevada capacidade de remodelação fisiológica e metabólica, representando janelas de oportunidade para intervenções capazes de modificar, ao menos parcialmente, fenótipos previamente programados (Hanson & Gluckman, 2014; Fleming et al., 2018). Dentre essas fases, destaca-se o período puberal.

Durante a puberdade, diversas alterações hormonais, neuroendócrinas e metabólicas ocorrem de forma coordenada, promovendo a remodelação de sistemas envolvidos na regulação da homeostase energética, da sensibilidade à insulina e do metabolismo dos nutrientes (Spear, 2000; Sawyer et al., 2018), conferindo a este período elevada capacidade de adaptação frente aos estímulos ambientais (Viner et al., 2017; National Academies, 2019). Essa reorganização funcional cria condições favoráveis para que intervenções nutricionais ou farmacológicas exerçam efeitos mais pronunciados sobre trajetórias metabólicas previamente estabelecidas (Burton & Alonso, 2024; Skowronski et al., 2024).

Sob essa perspectiva, a puberdade passou a ser considerada uma fase estratégica para intervenções destinadas à modulação de alterações metabólicas previamente programadas. Esse entendimento ampliou as possibilidades experimentais dentro do conceito DOHaD, originalmente direcionado ao estudo das exposições precoces, ao incorporar abordagens voltadas não apenas à compreensão dos mecanismos da programação metabólica, mas também à investigação de potenciais estratégias que sejam capazes de atenuar suas repercussões, a fim de reduzir a progressão de disfunções metabólicas associadas à obesidade (National Academies, 2019; Burton & Alonso, 2024).

1.4 Homeostase energética: integração entre fígado e músculo esquelético

A homeostase energética consiste no equilíbrio entre a disponibilidade, o armazenamento e a utilização de energia, permitindo que o organismo ajuste continuamente seu metabolismo em resposta às variações na oferta de nutrientes e às demandas fisiológicas (Scholtes & Giguère, 2022). Esse processo depende da integração funcional entre diferentes órgãos e tecidos metabolicamente ativos, que,

por meio da coordenação de sinais neurais, hormonais e metabólicos, regulam o metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, assegurando a disponibilidade energética necessária ao funcionamento celular e à manutenção da homeostase sistêmica (Petersen et al., 2017; Rui, 2014; Scholtes & Giguère, 2022).

Entretanto, esse equilíbrio pode ser comprometido em condições de excesso nutricional, como observado na obesidade. Nessa condição, a capacidade fisiológica de ajustar adequadamente a captação, armazenamento e utilização de energia torna-se progressivamente prejudicada, gerando alterações na regulação da glicemia, metabolismo lipídico e na sensibilidade à insulina (Petersen et al., 2017). Essa desregulação da homeostase energética está associada à perda da comunicação integrada entre tecidos metabolicamente ativos e sistemas regulatórios, resultando em adaptações inicialmente compensatórias que, quando persistentes, acarretam o desenvolvimento e a progressão de distúrbios metabólicos associados à obesidade (Rui, 2014; Petersen et al., 2017).

Considerando a integração entre os diferentes sistemas regulatórios envolvidos nesse processo, o fígado e o músculo esquelético são fundamentais para coordenarem os processos previamente mencionados, além da redistribuição energética (Xourafa et al., 2024). Embora desempenhem funções metabólicas distintas, tais tecidos atuam juntos para garantir a homeostase energética. Enquanto o fígado regula a disponibilidade sistêmica de nutrientes por meio do armazenamento, síntese e mobilização, o músculo esquelético é o principal tecido responsável pela captação e utilização de glicose estimulada pela insulina, além de constituir um importante reservatório proteico e glicogênico fisiológico (Petersen et al., 2017; Smith et al., 2023; Allard et al., 2024). Diante disso, o entendimento das funções exercidas por cada um desses órgãos e tecidos torna-se essencial para compreender os mecanismos envolvidos na homeostase energética e as disfunções desencadeadas pela obesidade.

1.4.1 Fígado

Além de atuar como importante regulador da homeostase energética, o fígado é um dos principais órgãos responsáveis pela integração do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, coordenando continuamente o armazenamento, a mobilização e a utilização desses substratos por meio da manutenção das vias anabólicas e catabólicas (Rui, 2014; Petersen et al., 2017). A execução de tais

funções depende da flexibilidade metabólica, definida como a capacidade de ajustar eficientemente a seleção e a utilização dos substratos energéticos em resposta às alterações na disponibilidade de nutrientes. Tal processo é regulado por sinais hormonais, nutricionais e neurais (Scholtes & Giguère, 2022; Xourafa et al., 2024; Zsombok et al., 2024). A insulina e o glucagon figuram entre os principais reguladores hormonais desse processo, exercendo ações antagônicas sobre o metabolismo hepático ao promoverem, respectivamente, o armazenamento de energia no estado alimentado e a mobilização de substratos energéticos durante a privação alimentar, permitindo que o fígado module continuamente seu metabolismo conforme as necessidades fisiológicas do organismo (Titchenell et al., 2017; Petersen et al., 2017).

Dentre os processos metabólicos regulados por tais hormônios, o metabolismo glicídico se destaca, sendo essencial para a manutenção da glicemia e do equilíbrio energético. Nos hepatócitos, o transporte de glicose ocorre predominantemente por meio do GLUT2, transportador que permite o fluxo bidirecional desse substrato entre o fígado e a circulação, possibilitando sua entrada nos hepatócitos no estado alimentado e sua liberação durante a privação alimentar (Mueckler & Thorens, 2013; Thorens, 2015; Rui, 2014; Petersen et al., 2017). Tal capacidade de ajuste bidirecional decorre das propriedades cinéticas do GLUT2, caracterizado por elevado K_m (~17 mM), refletindo baixa afinidade aparente pela glicose e alta capacidade de transporte, o que permite que o fluxo desse substrato acompanhe suas variações fisiológicas (Mueckler & Thorens, 2013; Sun et al., 2023; van de Graaf et al., 2024).

Assim, no estado alimentado, a glicose captada pelos hepatócitos é direcionada principalmente para vias de armazenamento e utilização energética (Petersen et al., 2017; Titchenell et al., 2017). Parte desse substrato é armazenada na forma de glicogênio, enquanto outra é metabolizada pela glicólise, originando piruvato, posteriormente convertido em acetil-CoA (Rui, 2014; Berg et al., 2019). Além de ser oxidado no ciclo de Krebs para produção de ATP, o acetil-CoA é um importante precursor para a síntese de ácidos graxos, estabelecendo a integração funcional entre o metabolismo glicídico e lipídico (Rui, 2014; Nelson & Cox, 2021). Em contraste, durante a privação alimentar, o fígado mobiliza inicialmente suas reservas de glicogênio por meio da glicogenólise e, posteriormente, intensifica a gliconeogênese a partir de lactato, glicerol e aminoácidos glicogênicos (Petersen et

al., 2017; Scoditti et al., 2024). Tais mecanismos garantem a manutenção da glicemia e o suprimento contínuo de glicose aos tecidos glicodependentes (Rui, 2014; Petersen et al., 2017).

Além de regular o metabolismo glicídico, o fígado é igualmente essencial na homeostase lipídica, gerenciando a captação, síntese, oxidação, armazenamento e distribuição de lipídios de acordo com o estado nutricional e as demandas energéticas (Bo et al., 2024). Para tais funções, este órgão recebe lipídios provenientes de diferentes fontes, incluindo os remanescentes de quilomícrons oriundos da absorção intestinal, ácidos graxos não esterificados liberados pela lipólise do tecido adiposo e aqueles sintetizados endogenamente por meio da lipogênese *de novo* (Rui, 2014; Bo et al., 2024). O funcionamento integrado dessas vias permite que o fígado direcione os ácidos graxos para oxidação mitocondrial, armazenamento na forma de triacilgliceróis ou secreção como lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), adaptando de forma responsiva o metabolismo lipídico às necessidades fisiológicas (Rui, 2014; Bo et al., 2024). Tal processo permite a distribuição lipídica aos tecidos periféricos, evitando o acúmulo excessivo de triacilgliceróis no tecido hepático (Petersen et al., 2017; Bo et al., 2024).

Ademais, durante a privação alimentar, com a redução da sinalização insulínica associada à ação do glucagon e das catecolaminas, estimula-se a lipólise no tecido adiposo, aumentando a liberação de ácidos graxos não esterificados para a circulação (Rui, 2014; Titchenell et al., 2017). Após sua captação pelos hepatócitos, estes substratos são direcionados para a β -oxidação mitocondrial, processo responsável pela geração de acetil-CoA e ATP, suprimindo as demandas energéticas hepáticas durante privação alimentar e jejum prolongado (Nelson & Cox, 2021; Xourafa et al., 2024). Cabe destacar, ainda, que o fígado também é importante para a manutenção do colesterol, regulando de forma coordenada sua síntese, captação, utilização e excreção (Bo et al., 2024). Nesse contexto, a conversão do colesterol em ácidos biliares constitui processo essencial para a digestão e absorção intestinal de lipídios, além de representar a principal via de excreção do excesso de colesterol (Scholtes & Giguère, 2022; Xourafa et al., 2024; Bo et al., 2024). Assim, esses processos permitem ao fígado manter o equilíbrio energético diante das variações do estado nutricional.

Entretanto, na obesidade, a exposição crônica ao excesso de nutrientes compromete progressivamente esse controle dinâmico, reduzindo a flexibilidade

metabólica hepática e limitando sua capacidade de adaptar o metabolismo às alterações do estado nutricional. Nesse cenário, o predomínio persistente das vias de armazenamento lipídico sobre os mecanismos de utilização e exportação favorece o acúmulo de triacilgliceróis nos hepatócitos e o estabelecimento da resistência hepática à insulina (Petersen et al., 2017; Bo et al., 2024; Scoditti et al., 2024). Em resposta a estas alterações, a insulina torna-se insuficiente para suprimir adequadamente a produção hepática de glicose, enquanto a lipogênese de novo permanece elevada, contribuindo para a hiperglicemia, o acúmulo lipídico intra-hepático e, por fim, progressão da disfunção metabólica (Titchenell et al., 2017; Bo et al., 2024). Esse mesmo excesso de fluxo lipídico e a sobrecarga mitocondrial dele decorrente têm sido consistentemente associados a maior produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a desequilíbrio redox no fígado em diferentes modelos experimentais de obesidade (Furukawa et al., 2004; Yu et al., 2023), achados discutidos com mais profundidade na seção seguinte, que também fundamentam a avaliação da homeostase redox hepática realizada neste trabalho.

1.4.2 Músculo esquelético

Representando aproximadamente 40% da massa corporal total (Smith et al., 2023), o músculo esquelético (ME) é reconhecido como um dos tecidos mais metabolicamente ativos e plásticos do organismo. Além de suas funções mecânicas e de locomoção, atua como um órgão endócrino e metabólico central, responsável por coordenar o balanço energético global e a partição de nutrientes entre diferentes sistemas orgânicos (Smith et al., 2023; Richter et al., 2025). Devido à sua expressiva magnitude tecidual, o ME possui importante ação na regulação do metabolismo sistêmico, destacando-se historicamente como o principal sítio de utilização periférica de substratos energéticos em resposta a estímulos hormonais (DeFronzo & Tripathy, 2009).

O desempenho de tal função depende da ativação de vias de sinalização intracelulares, desencadeadas principalmente pela ação da insulina. Após a ligação deste hormônio ao seu receptor, ocorre a ativação da via PI3K/Akt, promovendo a translocação dos transportadores de glicose do tipo 4 (GLUT4) para a membrana plasmática dos miócitos, aumentando a captação glicêmica (DeFronzo & Tripathy, 2009; Richter et al., 2025). Uma vez internalizada, a glicose pode ser direcionada imediatamente para a produção de ATP por meio da glicólise e da

fosforilação oxidativa ou ser armazenada em forma de glicogênio, principal reserva de carboidratos do organismo (Smith et al., 2023; Richter et al., 2025). A interação entre esses mecanismos confere ao ME elevada flexibilidade metabólica, permitindo que a utilização de glicose e lipídios seja continuamente ajustada às condições nutricionais, hormonais e funcionais, assegurando o atendimento das demandas energéticas em diferentes estados fisiológicos.

Apesar de compartilhar mecanismos comuns de captação e utilização glicêmica, o ME apresenta marcante heterogeneidade estrutural e funcional entre os diferentes grupos musculares. Nesse contexto, os músculos diferem quanto à composição de proteínas contráteis, conteúdo mitocondrial, à atividade enzimática e às vias predominantes de produção de ATP, apresentando capacidades oxidativas e glicolíticas distintas, ou seja, especializações funcionais próprias de cada grupo muscular (Schiaffino & Reggiani, 2011; Smith et al., 2023). Consequentemente, cada grupo muscular responde desigualmente às alterações do estado nutricional, aos estímulos hormonais e às demandas fisiológicas (Smith et al., 2023; Richter et al., 2025). Dessa forma, o músculo gastrocnêmio (MG) e o músculo sóleo (MS) são amplamente utilizados em modelos experimentais para a investigação das adaptações do metabolismo muscular (Hayasaki, 2001; Schiaffino & Reggiani, 2011).

O MG apresenta predominância de fibras do tipo II, especialmente do subtipo IIx/IIb em roedores, conferindo-lhe alta capacidade glicolítica e rápida geração de ATP, características que favorecem a captação glicêmica durante contrações de alta intensidade e curta duração (Hayasaki, 2001; Schiaffino & Reggiani, 2011). Em contraste, o MS é constituído predominantemente por fibras do tipo I, caracterizadas por elevada densidade mitocondrial, maior atividade de enzimas oxidativas e capacidade de oxidação de ácidos graxos, sustentando atividades prolongadas e de menor intensidade (Schiaffino & Reggiani, 2011; Qaisar et al., 2016a; Smith et al., 2023). Tais diferenças estruturais e metabólicas conferem papéis distintos na homeostase energética e influenciam diretamente a sensibilidade à insulina, a captação de glicose e a utilização lipídica, tornando MG e MS diferencialmente suscetíveis às alterações induzidas pela obesidade (Smith et al., 2023; Richter et al., 2025).

Tal exposição crônica ao excesso de nutrientes, característica da obesidade, promove um aumento sustentado da disponibilidade de ácidos graxos para o ME, favorecendo o acúmulo de lipídios intramiocelulares e de metabólitos

lipídicos bioativos, como diacilgliceróis e ceramidas (Koves et al., 2008; Smith et al., 2023). Estes metabólitos comprometem a sinalização da insulina, reduzindo a ativação da via PI3K/Akt e a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, limitando a captação glicêmica pelos miócitos, o que contribui para o estabelecimento da resistência insulínica no ME (Koves et al., 2008; Petersen & Shulman, 2018; Smith et al., 2023; Richter et al., 2025).

Apesar desse comprometimento, a contração muscular pode estimular a captação de glicose por mecanismos independentes da insulina. O aumento da demanda energética intracelular, associado às alterações na concentração de Ca^{2+} citosólico e à ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), desencadeia vias de sinalização que também promovem a translocação do GLUT4 para a membrana plasmática, aumentando a captação glicêmica mesmo em condições de resistência insulínica (Richter & Hargreaves, 2013; Sylow et al., 2017; Richter et al., 2025). Entretanto, embora represente um importante mecanismo compensatório, essa resposta também pode tornar-se parcialmente comprometida na obesidade.

A persistência dessas disfunções compromete a flexibilidade metabólica do ME, reduzindo sua capacidade de alternar eficientemente entre a utilização de glicose e lipídios conforme as demandas fisiológicas (Koves et al., 2008; Smith et al., 2023; Richter et al., 2025). Adicionalmente, a alta disponibilidade de substratos energéticos eleva o fluxo de oxidação mitocondrial, gerando a sobrecarga mitocondrial funcional, a produção de ERO e o estabelecimento de um ambiente pró-oxidante (Blüher, 2019). Coletivamente, tais processos desencadeiam respostas inflamatórias e modificações celulares que favorecem a progressão da resistência à insulina e das disfunções metabólicas associadas à obesidade (Koves et al., 2008; Blüher, 2019; Smith et al., 2023; Richter et al., 2025).

A sucessão das alterações metabólicas induzidas pela obesidade varia entre os diferentes grupos musculares, refletindo respostas músculo-específicas. Nesse sentido, evidências demonstram que em modelos experimentais de obesidade induzida por dieta, o MG apresenta maior acúmulo de lipídios intramiocelulares e alterações relacionadas ao metabolismo energético quando comparado ao MS, sugerindo maior suscetibilidade às alterações induzidas pela obesidade (Shortreed et al., 2009). Em contrapartida, embora o MS apresente relativa preservação de alguns parâmetros metabólicos nas fases iniciais da obesidade, a exposição prolongada à supernutrição também promove modificações

no metabolismo lipídico e adaptações mitocondriais distintas (Kaneko et al., 2011; Cabot et al., 2012; Morales et al., 2021). Diante dessas diferenças fisiológicas e metabólicas, a avaliação conjunta do MG e do MS permite investigar de forma mais abrangente como a programação metabólica induzida pela supernutrição neonatal compromete músculos com perfis distintos, bem como se diferentes intervenções terapêuticas modulam essa resposta de maneira músculo-específica.

1.5 Estresse oxidativo e inflamação associados à Obesidade

Além das alterações metabólicas observadas em diferentes órgãos e tecidos, a obesidade desencadeia uma série de respostas celulares que contribuem para a progressão de complicações sistêmicas (Saltiel & Olefsky, 2017; Blüher, 2019). Atualmente, tal doença, de caráter crônico e multifatorial, é reconhecida não apenas pelo acúmulo excessivo de adiposidade, mas também por promover alterações persistentes sobre a homeostase celular. Tais modificações são caracterizadas pelo desequilíbrio entre processos pró-oxidantes e antioxidantes, além da ativação sustentada de vias inflamatórias, sendo componentes fundamentais de sua fisiopatologia (Furukawa et al., 2004; Hotamisligil, 2006).

Um dos principais componentes desse quadro é o desequilíbrio da homeostase redox, caracterizado por um desbalanço dinâmico entre a produção de ERO e de nitrogênio (ERN), que são oxidantes, e a capacidade dos sistemas antioxidantes celulares de manter suas concentrações fisiológicas. Essa manutenção constitui condição necessária para que essas moléculas desempenhem funções essenciais, incluindo a sinalização intracelular, a regulação da expressão gênica, a proliferação celular e a resposta imune (Furukawa et al., 2004; Sies et al., 2024). O organismo dispõe de um sistema de defesa antioxidante a fim de preservar a homeostase redox, constituído por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos, que atuam de forma integrada na limitação do acúmulo de ERO e na manutenção das funções celulares (Sies et al., 2024; Halliwell, 2024). Entre os principais componentes enzimáticos destacam-se a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT), que atuam sequencialmente na conversão de ERO em moléculas menos oxidantes. Já os mecanismos não enzimáticos incluem compostos de baixo peso molecular, como a glutatona reduzida (GSH) e o ácido úrico, além de antioxidantes obtidos pela dieta, como as vitaminas C e E, que neutralizam ERO e regeneram outros antioxidantes (Yu et al., 2023; Sies et al., 2024).

Portanto, quando a produção de ERO excede a capacidade dos sistemas antioxidantes, estabelece-se o estresse oxidativo (EO), promovendo danos oxidativos a biomoléculas essenciais (Betteridge, 2000; Sies et al., 2024; Halliwell, 2024). É o caso da peroxidação lipídica, resultante do ataque de ERO aos ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, que, por meio de uma reação em cadeia, compromete sua integridade e dá origem a aldeídos altamente reativos, como o malondialdeído (MDA), um dos principais marcadores de dano oxidativo aos lipídios (Moldogazieva et al., 2023; Halliwell, 2024). Ainda, a oxidação de proteínas promove modificações estruturais e funcionais capazes de comprometer sua atividade e estabilidade, sendo frequentemente avaliada pela formação de grupos carbonila (protein carbonyls, PCO), importante marcador de dano oxidativo às proteínas (Akagawa, 2021; Halliwell, 2024). Assim, tais processos comprometem a integridade celular e favorecem a disfunção de tecidos metabolicamente ativos, contribuindo para o desenvolvimento e agravamento de diversos distúrbios e doenças, incluindo a obesidade (Saltiel & Olefsky, 2017; Yu et al., 2023). Ainda, é reconhecida como uma condição de aumento de citocinas pró inflamatórias, decorrente da expansão e disfunção do tecido adiposo.

Nesse contexto, adipócitos hipertrofiados e células imunes infiltradas passam a secretar maiores quantidades de mediadores pró-inflamatórios e menores concentrações de adipocinas anti-inflamatórias, promovendo a ativação sustentada da resposta inflamatória (Hotamisligil, 2006; Saltiel & Olefsky, 2017; Lee & Olefsky, 2021). Além de comprometer diretamente a integridade celular, o EO atua como um importante mediador da ativação e da manutenção da resposta inflamatória associada à obesidade (Saltiel & Olefsky, 2017; Sies, 2024; LeFort, 2024). O excesso de ERO ativa vias de sinalização intracelulares sensíveis ao estado redox, entre as quais se destaca a via de sinalização mediada pelo fator nuclear kappa B (NF- κ B), considerada uma das principais reguladoras da resposta inflamatória (Morgan & Liu, 2011; Lee & Olefsky, 2021). Uma vez ativado, o NF- κ B induz a transcrição de diversos genes pró-inflamatórios, incluindo citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6) e a proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1). Esse processo promove o recrutamento e a ativação de diferentes populações de leucócitos, especialmente neutrófilos e macrófagos, células que amplificam a resposta inflamatória por meio da liberação de ERO, citocinas e enzimas inflamatórias (Blüher, 2019; Lee & Olefsky, 2021; LeFort, 2024).

Esse ciclo de retroalimentação positiva repercute diretamente sobre órgãos envolvidos na homeostase metabólica, como o fígado e o músculo esquelético, contribuindo para a persistência do ambiente fisiopatológico característico da obesidade (Saltiel & Olefsky, 2017; Petersen & Shulman, 2018; Lee & Olefsky, 2021). Como consequência, o EO e a inflamação constituem processos intimamente interdependentes, sustentando grande parte das alterações celulares e metabólicas observadas na obesidade (Saltiel & Olefsky, 2017; Lee & Olefsky, 2021; Sies et al., 2024). A manutenção desse ambiente pró-oxidante e pró-inflamatório compromete progressivamente a funcionalidade de tecidos metabolicamente ativos, como os mencionados anteriormente (Lee & Olefsky, 2021; Petersen & Shulman, 2018; LeFort et al., 2024). Diante da relevante participação desses mecanismos na fisiopatologia da obesidade, estratégias capazes de restaurar o equilíbrio redox e mitigar a resposta inflamatória têm sido amplamente investigadas como abordagens terapêuticas promissoras (Lee & Olefsky, 2021; Sies et al., 2024).

1.6 Vitamina C como estratégia terapêutica

Frente ao aumento da produção de ERO característico da obesidade, a manutenção da homeostase redox depende da atuação integrada do sistema antioxidante, composto por mecanismos enzimáticos e não enzimáticos (Halliwell, 2024; Sies et al., 2024). Dentre os componentes não enzimáticos, a vitamina C (vitC, ácido ascórbico) se destaca como um antioxidante hidrossolúvel naturalmente presente em diversos alimentos de origem vegetal e que também pode ser administrado na forma de suplementação (Carr & Vissers, 2013; Ramanujan et al., 2024). Após sua absorção e distribuição aos tecidos, a vitC desempenha funções de alta relevância. Atua como cofator de diversas enzimas envolvidas em processos fisiológicos essenciais, incluindo a síntese de colágeno, a biossíntese de neurotransmissores, como noradrenalina e serotonina, além de atuar na regulação da expressão gênica por mecanismos epigenéticos, como a desmetilação de DNA e histonas (Padayatty et al., 2003; Carr & Maggini, 2017; Lykkesfeldt et al., 2024). Ainda, possui um importante papel na regulação da resposta inflamatória e na função de diferentes células do sistema imune, indicando seu potencial terapêutico em condições caracterizadas por infiltração de citocinas pró inflamatórias e EO (Carr & Maggini, 2017; Lykkesfeldt et al., 2024).

Entre as distintas funções da vitC, destaca-se a atuação sobre a defesa antioxidante, exercida por mecanismos diretos e indiretos, que atuam de forma complementar, a fim de limitar o dano oxidativo e preservar o equilíbrio redox celular (Padayatty et al., 2003; Halliwell, 2024; Lykkesfeldt & Carr, 2024). A vitC neutraliza diretamente diferentes espécies reativas presentes nos compartimentos intra e extracelulares, atenuando também sua propagação (Padayatty et al., 2003; Sies et al., 2024). Paralelamente, regenera antioxidantes endógenos, como a glutathiona (GSH), além de auxiliar na restauração da atividade antioxidante da vitamina E após sua oxidação, aprimorando a eficiência das defesas antioxidantes celulares (Winkler et al., 1994; Halliwell, 2024). Dessa maneira, tais mecanismos otimizam a resposta celular frente a sucessivos desafios oxidativos.

Além de suas atuações descritas anteriormente, a vitC também participa da modulação da resposta inflamatória tecidual. Ao limitar o acúmulo de ERO, limita a ativação de vias de sinalização redox-sensíveis, como a NF- κ B, reduzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a TNF- α , IL-1 β e IL-6, e também quimiocinas envolvidas no recrutamento leucocitário (Carr & Maggini, 2017; Lee & Olefsky, 2021; Halliwell, 2024). Consequentemente, o recrutamento, a infiltração e a ativação de diferentes células inflamatórias nos tecidos é reduzida (Carr & Maggini, 2017; Wilson et al., 2024).

Os neutrófilos constituem um exemplo relevante dessa modulação: sua infiltração pode ser estimada indiretamente pela atividade da mieloperoxidase (MPO), uma heme peroxidase que catalisa a formação de oxidantes altamente reativos, contribuindo tanto para a atividade microbicida quanto para o aumento do EO e da resposta inflamatória tecidual quando excessivamente ativada (Rizo-Téllez et al., 2022). Da mesma forma, destacam-se os macrófagos, cuja infiltração pode ser expressa indiretamente pela atividade da enzima lisossomal N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), uma hidrolase abundante em tais células que é utilizada como marcador tanto de sua infiltração quanto ativação nos tecidos, refletindo o aumento da atividade fagocítica característica da resposta inflamatória (Dean et al., 1979; Le Thuc & García-Cáceres, 2024).

Assim, antes de discutir as evidências experimentais disponíveis, é importante considerar uma particularidade dos modelos animais. Diferentemente dos seres humanos, os roedores são capazes de sintetizar vitC endogenamente a partir da glicose, por meio da enzima L-gulonolactona oxidase (Linster & Van Schaftingen,

2007). Entretanto, a síntese endógena não é o único determinante da disponibilidade biológica de vitC, considerando que é continuamente ajustada às demandas fisiológicas e patológicas do organismo (Lykkesfeldt & Tveden-Nyborg, 2019). Em condições caracterizadas por intenso EO e inflamação, o elevado consumo metabólico de vitC modifica sua disponibilidade tecidual, de modo que a suplementação exógena pode elevar suas concentrações, potencializando seus efeitos mesmo em espécies capazes de sintetizá-la (Carr & Maggini, 2017; Lykkesfeldt & Tveden-Nyborg, 2019; Wilson et al., 2024). Considerando os mecanismos previamente descritos, a vitC tem sido estudada como estratégia para atenuar o EO e a inflamação característicos da obesidade. Tais pesquisas fornecem sólido embasamento biológico sobre o potencial terapêutico que a vitC pode ter perante a obesidade e as comorbidades associadas (Carr & Maggini, 2017; Lee & Olefsky, 2021; Halliwell, 2024; Lykkesfeldt et al., 2024).

Embora os efeitos desse antioxidante tenham sido investigados em diferentes modelos experimentais, a maior parte desses estudos foi conduzida em animais adultos submetidos a dietas hiperlipídicas, hipercalóricas ou ricas em gordura. Nesses modelos, a vitC atenuou o ganho de peso corporal, a expansão da adiposidade e hipertrofia dos adipócitos viscerais, embora esses efeitos não tenham sido observados de maneira uniforme entre os diferentes protocolos experimentais (Garcia-Diaz et al., 2009; Park et al., 2018; Lee et al., 2018; Jiang et al., 2022). Adicionalmente, em relação ao metabolismo glicídico, foi evidenciada a redução da hiperinsulinemia e resistência à insulina, bem como melhora da tolerância à glicose, principalmente em modelos caracterizados pelo maior comprometimento metabólico e predisposição à disfunção induzida pela dieta (Garcia-Diaz et al., 2009; Park et al., 2018; Jiang et al., 2022; Jeon et al., 2023).

Cabe destacar, ainda, que atenuou a progressão de alterações inflamatórias e histopatológicas hepáticas, além de reduzir outros marcadores associados à esteatose hepática (Lee et al., 2018; Zeng et al., 2020; Lee et al., 2022; Jiang et al., 2022). Esses efeitos foram acompanhados por menor dano oxidativo, preservação das defesas antioxidantes e atenuação de marcadores inflamatórios em outros tecidos metabolicamente ativos; por fim, a vitC modulou vias relacionadas à oxidação de ácidos graxos e ao metabolismo lipídico tecidual (Lee et al., 2018; Drehmer et al., 2019a; Zeng et al., 2020; Lee et al., 2022). Em conjunto, as evidências obtidas fornecem suporte experimental para aprimorar a investigação da

vitC como potencial estratégia terapêutica, capaz de mitigar diferentes componentes da disfunção metabólica associada à obesidade. Entretanto, vale ressaltar que seus efeitos variam conforme o modelo experimental utilizado, a gravidade das alterações metabólicas, a dose, a via e a duração da suplementação, bem como o momento em que a intervenção é iniciada e realizada.

Embora a suplementação com vitC tenha demonstrado efeitos benéficos sobre diversos marcadores da disfunção metabólica associada à obesidade em diferentes modelos experimentais, o conhecimento disponível permanece concentrado em intervenções realizadas em animais adultos submetidos à obesidade induzida por dieta. Permanecem escassos os estudos que investigam sua administração durante janelas de elevada plasticidade, como a puberdade, em modelos de programação metabólica induzida por supernutrição neonatal. Além disso, ainda não está esclarecido se os efeitos de uma intervenção realizada nesse período persistem após o término da suplementação.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que: 1. A supernutrição neonatal induzida pela redução do tamanho da ninhada promove alterações metabólicas persistentes que se estendem até a vida adulta; 2. O excesso de nutrientes e a expansão da adiposidade favorecem o estabelecimento do estresse oxidativo e ativação de citocinas pró inflamatórias, o que contribui para o desenvolvimento de comorbidades metabólicas; 3. que a suplementação com compostos antioxidantes têm demonstrado potencial para atenuar esses processos em diferentes modelos experimentais; 4. e que a puberdade constitui uma importante janela de plasticidade metabólica, durante a qual intervenções podem modular, ao menos parcialmente, alterações previamente programadas, torna-se relevante investigar os efeitos da suplementação com vitC durante o período peripuberal sobre a homeostase energética e sobre parâmetros metabólicos, oxidativos e inflamatórios em ratos jovens adultos com obesidade induzida pela redução do tamanho da ninhada.

A hipótese deste estudo foi de que a supernutrição durante a lactação programaria alterações persistentes na homeostase glicêmica e lipídica, acompanhadas por disfunções metabólicas, oxidativas e inflamatórias no fígado e no músculo esquelético. Adicionalmente, hipotetizou-se que a suplementação com vitC durante o período peripuberal seria capaz de atenuar tais repercussões, por meio do

fortalecimento das defesas antioxidantes e da recuperação, ao menos parcial, da homeostase metabólica, com efeitos detectáveis imediatamente e após o término da intervenção.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se a suplementação com vitamina C durante o período peripuberal é capaz de prevenir ou atenuar as alterações morfofisiológicas, metabólicas, redox e inflamatórias induzidas pela supernutrição neonatal em ratos Wistar, avaliadas no DPN 60 e no DPN 90.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Caracterizar os efeitos da suplementação com vitamina C sobre o perfil morfofisiológico dos animais.

b) *Determinar os efeitos da suplementação com vitamina C sobre o perfil lipídico plasmático e homeostase glicêmica.*

c) Caracterizar os efeitos da suplementação com vitamina C sobre o metabolismo energético hepático e muscular.

d) *Investigar os efeitos da suplementação com vitamina C sobre a homeostase redox e a inflamação hepática e muscular.*

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar, provenientes do acasalamento de 21 fêmeas com machos experientes, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). No dia do nascimento (dia pós-natal 0; DPN 0), o tamanho das ninhadas foi padronizado. Para formar a ninhada reduzida (SL; *small litter*), as ninhadas foram padronizadas para três filhotes (dois machos e uma fêmea). Já para compor o grupo controle (NL; *normal litter*), foram mantidos dez filhotes (cinco machos e cinco fêmeas), conforme descrito por de Souza et al., 2023. Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação.

Após o desmame, as fêmeas foram remanejadas para outro projeto, permanecendo apenas os machos no presente estudo. Estes foram alojados em caixas coletivas contendo quatro a cinco animais e mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, sob temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12h/12h. Foram fornecidas água e ração padrão (Nuvilab CR-1®, Nuvital, Brasil) *ad libitum* durante todo o protocolo experimental, exceto durante os períodos de privação alimentar prévios ao teste de tolerância à glicose (GTT) e à eutanásia. Os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (PROTOCOLO CEUA no 024/2020, OF. CIRC. CEUA no 87/2020).

4.2 Tratamento

Para o tratamento, foi utilizada vitamina C (ácido L-ascórbico; Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). A solução foi preparada diariamente em água corrente (utilizada também como veículo), e mantida protegida da luz até o momento da administração. A vitC foi administrada via oral, por gavagem, na dose fixa de 50 mg por animal/dia, durante 30 dias consecutivos (DPN 30-59), conforme protocolo adaptado de Fernandes et al. (2011). O volume administrado foi padronizado em 250 µL por animal/dia.

4.3 Delineamento experimental

Compreendeu dois protocolos, diferenciados pelo momento da realização do GTT e da eutanásia: Protocolo I (DPN 60), destinado à avaliação dos efeitos imediatos, e Protocolo II (DPN 90), destinado à avaliação dos efeitos tardios. Em ambos os protocolos, os animais foram submetidos ao mesmo modelo experimental, diferindo apenas quanto ao período de acompanhamento após o término do tratamento.

4.3.1 Avaliação dos efeitos da suplementação com vitamina C durante o período peripuberal sobre as alterações induzidas pela supernutrição neonatal em ratos Wistar, avaliadas no DPN 60 e no DPN 90.

O delineamento experimental está apresentado na Figura 1. Após a padronização das ninhadas no DPN 0, os animais foram pesados a cada três dias até o desmame (realizado no DPN 21). Após o desmame, quatro a cinco animais pertencentes ao mesmo grupo experimental foram mantidos por caixa coletiva. No DPN 30, os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: NL-Veículo (ninhada normal tratada com veículo), NL-vitC (ninhada normal tratada com vitamina C), SL-Veículo (ninhada reduzida tratada com veículo) e SL-vitC (ninhada reduzida tratada com vitamina C). A administração do veículo ou da vitamina C foi realizada diariamente, por gavagem, entre os DPN 30 e 59, totalizando 30 dias consecutivos de tratamento. Durante esse período, os animais foram pesados diariamente para monitoramento da evolução ponderal, e a ingestão alimentar também foi avaliada diariamente. Após o término da suplementação, os animais permaneceram em acompanhamento até a eutanásia, sendo o peso corporal e a ingestão alimentar monitorados a cada cinco dias.

No Protocolo I, o teste de tolerância à glicose (GTT) foi realizado no DPN 59, após seis horas de privação alimentar. No Protocolo II, o procedimento foi realizado de forma idêntica no DPN 89. Ao final de cada protocolo experimental (protocolo I – DPN 60; protocolo II – DPN 90), foram mensurados o peso corporal e a distância nasoanal para posterior cálculo do índice de Lee. Após seis horas de privação alimentar, realizada para padronização do estado nutricional dos animais, estes foram submetidos à eutanásia por decapitação. O sangue foi coletado para obtenção de plasma destinado às análises bioquímicas subsequentes. Em seguida, os tecidos adiposos epididimal (TAE) e retroperitoneal (TAR) foram dissecados e pesados.

O fígado foi removido e, de forma padronizada, o lobo lateral esquerdo foi coletado para as análises dos parâmetros metabólicos, da homeostase redox e da infiltração de células inflamatórias. Os músculos gastrocnêmio e sóleo também foram removidos e destinados às análises dos mesmos parâmetros. Para padronização das análises musculares, foi coletada a porção superficial e intermediária do músculo gastrocnêmio, cuja aparência macroscópica permite identificar a predominância de fibras brancas (Hayasaki et al., 2001). Todos os tecidos foram imediatamente armazenados em ultra-freezer (-80 °C) até a realização das análises experimentais.

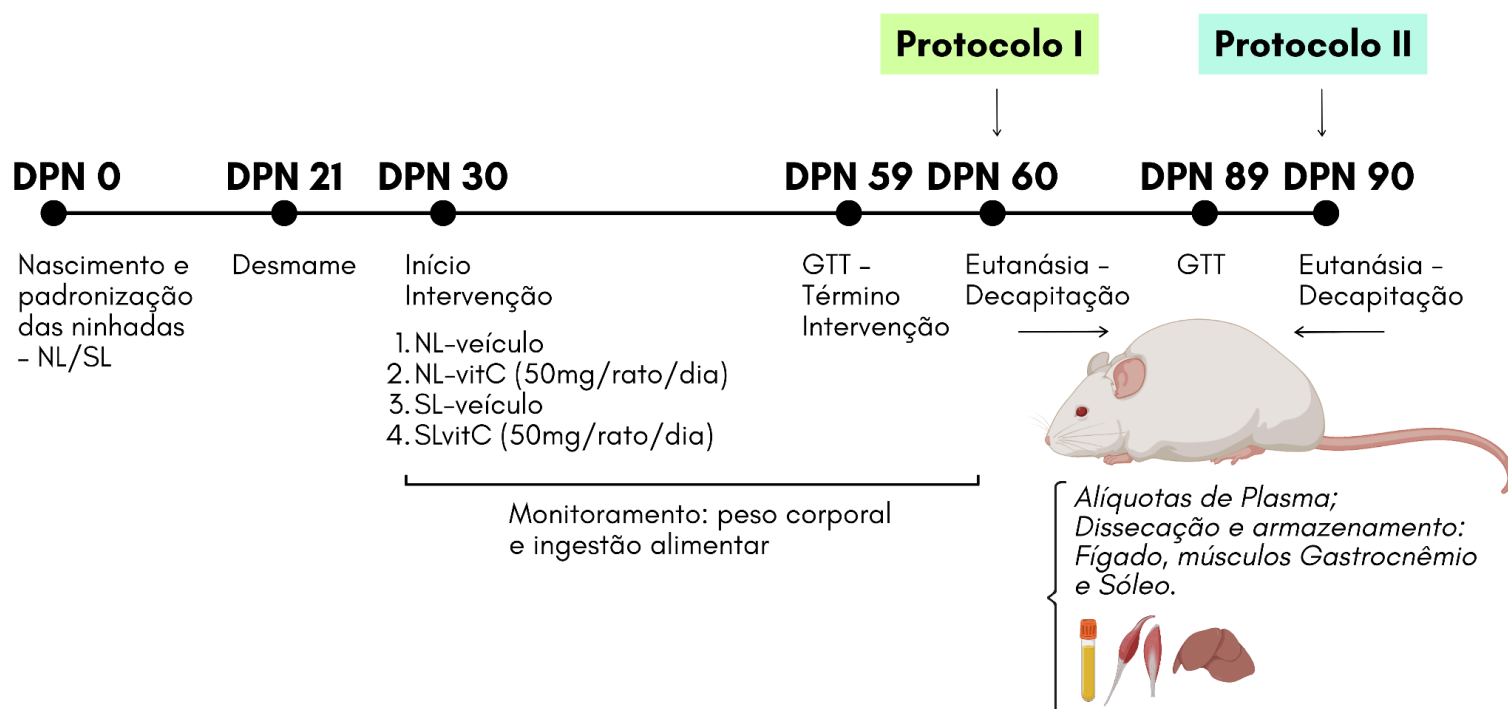


Figura 1. Linha do tempo do delineamento experimental do protocolo utilizado no estudo.

4.4 Perfil Morfofisiológico

4.4.1 Aferição do peso corporal

O peso corporal dos animais foi aferido do nascimento (DPN 0) até o desmame (DPN 21), com pesagens realizadas a cada três dias. Durante o período de suplementação (DPN 30-59), os animais foram pesados diariamente para monitoramento da evolução ponderal. Após o término do tratamento, o peso corporal foi aferido no DPN 60 (Protocolo I) ou em intervalos de cinco dias até o DPN 90 (Protocolo II). Os dados obtidos foram utilizados para determinação do ganho de peso corporal nos diferentes períodos experimentais e para o acompanhamento da evolução ponderal dos animais.

4.4.2 Cálculo da Ingestão alimentar

A ingestão alimentar foi determinada em caixas coletivas contendo quatro ou cinco animais pertencentes ao mesmo grupo experimental. Foi registrada a quantidade de ração fornecida e, posteriormente, pesada a ração remanescente. O consumo alimentar da caixa foi obtido pela diferença entre a quantidade de ração ofertada e a quantidade remanescente. Em seguida, o valor foi dividido pelo número

de animais da caixa e pelo número de dias do intervalo correspondente, sendo posteriormente corrigido para 100 g de peso corporal e expresso em g/100 g de peso corporal/dia.

4.4.3 *Determinação da Eficiência Energética*

A eficiência energética foi determinada, no presente estudo, pela razão entre o ganho de peso corporal e o consumo alimentar total correspondente ao período avaliado, conforme empregado para determinação da eficiência alimentar em estudos experimentais com roedores (Naim et al., 1980; Ha et al., 2012). Para o Protocolo I, foi considerado o ganho de peso corporal entre o DPN 30 e 60, dividido pelo consumo alimentar total registrado no mesmo intervalo. Para o Protocolo II, o cálculo foi realizado utilizando o ganho de peso corporal entre os DPNs 60 e 90 e o consumo alimentar total correspondente ao mesmo período. Os resultados foram expressos em gramas de ganho de peso por grama de alimento consumido (g/g).

4.4.4 *Determinação do Índice de Lee*

O índice de Lee foi utilizado como indicador indireto da obesidade corporal. É amplamente empregado em estudos experimentais por apresentar boa correlação com o grau de obesidade em roedores, tornando-se uma ferramenta útil para avaliação do estado nutricional dos animais (Bernardis & Patterson, 1968; Malafaia et al., 2013). Para sua determinação, antes da eutanásia, foram mensurados o peso corporal e a distância nasoanal dos animais. O índice foi calculado pela razão entre a raiz cúbica do peso corporal (g) e o comprimento nasoanal (cm), conforme descrito por Bernardis e Patterson (1968).

4.4.5 *Determinação do peso dos tecidos adiposos viscerais*

Após a eutanásia, os tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal foram dissecados e pesados. Para permitir a comparação entre animais com diferentes pesos corporais, os valores obtidos foram normalizados em relação ao peso corporal individual e expressos em g/100 g de peso corporal.

4.4.6 *Determinação do peso dos músculos Gastrocnêmio e Sóleo*

Os músculos gastrocnêmio e sóleo foram removidos imediatamente após a eutanásia e pesados individualmente. Os valores obtidos foram normalizados

em relação ao peso corporal individual dos animais e expressos em g/100 g de peso corporal.

4.5 Determinação das concentrações plasmáticas de lipídios

Após a eutanásia por decapitação, o sangue foi coletado em tubos contendo heparina e centrifugado a 3.000 r.p.m durante 20 minutos a 4 °C. O plasma obtido foi aliquoteado e armazenado a -20 °C até a realização das análises. As concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-colesterol e triacilgliceróis foram determinadas por espectrofotometria utilizando kits comerciais, conforme descrito a seguir.

4.5.1 Determinação das concentrações plasmáticas de Colesterol total, colesterol-HDL e Triacilgliceróis

As concentrações plasmáticas de colesterol total, colesterol-HDL e triacilgliceróis foram determinadas por método enzimático colorimétrico, utilizando kits comerciais específicos para cada analito: Colesterol Total Enzimático, Colesterol HDL Enzimático e Triglicérides Enzimático (Vida Biotecnologia®, Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas por espectrofotometria.

4.6 Avaliação da homeostase glicêmica

4.6.1 Determinação das concentrações plasmáticas de glicose e insulina

As concentrações plasmáticas de glicose e insulina foram determinadas em amostras de plasma obtidas no momento da eutanásia. A glicose foi quantificada por método enzimático colorimétrico, utilizando kit comercial específico (Glicose Enzimática, Vida Biotecnologia®, Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme as instruções do fabricante, com leitura espectrofotométrica. A concentração plasmática de insulina foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA), empregando kit comercial específico (MilliporeSigma, Burlington, MA, USA), também de acordo com as recomendações do fabricante.

4.6.2 Teste de Tolerância à Glicose (GTT)

Essa análise foi realizada após seis horas de privação alimentar, no DPN 59 (Protocolo I) e no DPN 89 (Protocolo II). Inicialmente, foi coletada uma gota de

sangue da extremidade da cauda para determinação da glicemia basal, utilizando tiras reagentes acopladas ao glicosímetro Accu-Chek Advantage II (Roche Diagnostics®, Mannheim, Alemanha). Em seguida, foi administrada solução de glicose a 25% por via intraperitoneal, na dose de 1,0 g/kg de peso corporal. Novas determinações da glicemia foram realizadas aos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração da glicose. Ao término do teste, os animais retornaram às suas caixas, com livre acesso à água e à ração, conforme descrito por De Souza et al. (2023).

4.6.3 Determinação dos índices HOMA-IR e HOMA- β

Os índices Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance (HOMA-IR) e Homeostatic Model Assessment for Beta-cell Function (HOMA- β) foram utilizados como estimativas indiretas da resistência à insulina e da função das células β pancreáticas, respectivamente. Ambos foram calculados a partir das concentrações plasmáticas de glicose e insulina obtidas após privação alimentar, conforme o modelo matemático proposto por Matthews et al. (1985). O HOMA-IR foi calculado pela razão entre o produto das concentrações de glicose e insulina em privação alimentar e a constante 405, enquanto o HOMA- β foi estimado pela relação entre a concentração de insulina em privação alimentar e a diferença entre a concentração de glicose (convertida para mmol/L) e a constante 3,5, multiplicada por 20.

4.6.4 Determinação do índice TyG

O índice Triglyceride-Glucose (TyG) foi utilizado como marcador indireto de resistência à insulina. O índice é calculado a partir das concentrações plasmáticas de glicose e triacilgliceróis obtidas após privação alimentar, conforme descrito por Simental-Mendía et al. (2008). Posteriormente, sua aplicação como marcador substituto de resistência à insulina foi amplamente validada em diferentes modelos e condições metabólicas (Guerrero-Romero et al., 2010).

4.7 Determinação das concentrações teciduais de metabólitos energéticos

Amostras de fígado, músculo gastrocnêmio e músculo sóleo foram pesadas e submetidas à extração bioquímica dos metabólitos, utilizando protocolo

adaptado de Carr et al. (1993) e Schaubroeck et al. (2022), com modificações metodológicas desenvolvidas em colaboração com Pedro Tenório (ainda não publicado). Inicialmente, os tecidos foram homogeneizados em reagente de Folch (clorofórmio:metanol, 2:1, v/v) e centrifugados a 10.000 rpm durante 2 minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para um novo microtubo e submetido à adição de solução de NaCl 0,73%, promovendo a separação das fases aquosa e orgânica. A fase orgânica foi evaporada em estufa a aproximadamente 60 °C e posteriormente ressuspensa em etanol absoluto para determinação dos metabólitos lipídicos. O pellet remanescente da homogeneização inicial foi lavado com etanol a 66% contendo sulfato de sódio a 0,73%, centrifugado e o sobrenadante reunido à fase destinada às análises lipídicas. O pellet residual foi ressuspensa em solução de NaOH a 20% e incubado a 100 °C por aproximadamente 10 minutos. Após resfriamento, adicionou-se etanol absoluto para precipitação, seguida de centrifugação e ressuspensão final do pellet em água destilada, destinada à determinação do glicogênio. Esse protocolo permitiu a obtenção de diferentes frações destinadas à quantificação de glicose, glicogênio, colesterol e triacilgliceróis nos tecidos analisados.

4.7.1 Determinação da concentração tecidual de glicose

Alíquotas da fração correspondente foram transferidas para microplacas de 96 poços e a concentração de glicose foi determinada por método enzimático colorimétrico utilizando kit comercial (Glicose Enzimática, Vida Biotecnologia®, Belo Horizonte, MG, Brasil), conforme as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas por espectrofotometria. Os resultados foram expressos em mg/g de tecido fresco.

4.7.2 Determinação da concentração tecidual de glicogênio

A concentração de glicogênio nos tecidos foi determinada pelo método colorimétrico do ácido sulfúrico-fenol. Para isso, alíquotas da fração correspondente foram transferidas para microtubos, submetidas à reação com fenol e ácido sulfúrico concentrado e a absorbância foi determinada por espectrofotometria. Os resultados foram expressos em mg/g de tecido fresco.

4.7.3 *Determinação das concentrações teciduais de colesterol e triacilgliceróis*

As concentrações teciduais de colesterol e triacilgliceróis foram determinadas na fração lipídica obtida após a extração bioquímica dos tecidos. Alíquotas dessa fração foram transferidas para microplacas de 96 poços e submetidas à quantificação por método enzimático colorimétrico, utilizando os kits comerciais Colesterol Total Enzimático (Vida Biotecnologia®, Belo Horizonte, MG, Brasil) e Triglicérides Enzimático (Bioliqid®, Pinhais, PR, Brasil), conforme as instruções dos respectivos fabricantes. As leituras foram realizadas por espectrofotometria, e os resultados foram expressos em mg/g de tecido fresco.

4.8 **Avaliação da homeostase redox**

A homeostase redox no fígado e nos músculos gastrocnêmio e sóleo foi avaliada por meio da determinação de marcadores de dano oxidativo, da produção de espécies reativas de oxigênio e das defesas antioxidantes dos tecidos. Para isso, foram utilizados diferentes meios de homogeneização, de acordo com a análise a ser realizada. Fragmentos do lobo lateral esquerdo hepático, músculo gastrocnêmio (porção superficial e intermediária) e do músculo sóleo, previamente armazenados em ultrafreezer (-80 °C), foram homogeneizados utilizando homogeneizador Ultra-Turrax (Marconi®) em diferentes soluções.

1) Para os ensaios de peroxidação lipídica (TBARS), carbonilação proteica, glutathiona reduzida (GSH), atividade da catalase (CAT) e atividade da superóxido dismutase (SOD), os tecidos foram homogeneizados em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,2). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), e os homogenatos foram posteriormente ajustados para a concentração de 1 mg de proteína/mL, utilizada na realização dos ensaios.

2) Para a determinação da produção de ânion superóxido pelo ensaio de redução do nitroblue tetrazolium (NBT), os tecidos foram homogeneizados em solução de EDTA 2 mM. A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), permitindo a normalização dos resultados obtidos.

3) E para os ensaios de capacidade antioxidante pelo radical ABTS e de poder antioxidante redutor férrico (FRAP), os tecidos foram homogeneizados em solução de KCl a 1,15%. O sobrenadante obtido foi utilizado nas análises, sendo

os resultados posteriormente corrigidos pela concentração proteica determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

4.8.1 *Determinação da peroxidação lipídica (Ensaio TBARS)*

A peroxidação lipídica foi avaliada pelo método das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS; *Thiobarbituric Acid Reactive Substances*), conforme descrito por Federici et al. (2007). O ensaio baseia-se na reação entre as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, principalmente o malondialdeído (MDA), e o ácido tiobarbitúrico, formando um complexo cromógeno cuja intensidade é proporcional ao grau de peroxidação lipídica. A absorbância foi determinada por espectrofotometria utilizando a diferença entre os comprimentos de onda de 535 e 572 nm. Os resultados foram normalizados pela concentração de proteínas e expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

4.8.2 *Determinação da carbonilação proteica*

A carbonilação proteica foi determinada conforme o método descrito por Reznick e Packer (1994). Inicialmente, os homogenatos teciduais foram centrifugados e as amostras que apresentaram razão de absorbância A260/A280 inferior a 1,0 foram tratadas com solução de sulfato de estreptomicina a 1% para remoção de ácidos nucleicos. Após nova centrifugação, o precipitado foi ressuspensionado em cloridrato de guanidina 6 M e incubado a 37 °C. O conteúdo de grupos carbonila foi determinado por espectrofotometria em 370 nm, utilizando curva padrão de albumina sérica (BSA; 0,25-2,0 mg/mL) para determinação da concentração proteica. Os resultados foram expressos em nmol de grupos carbonila/mg de proteína.

4.8.3 *Determinação da produção de ânion superóxido (NBT)*

A produção de ânion superóxido foi estimada pelo ensaio de redução do nitroblue tetrazolium (NBT), conforme descrito por Pinho-Ribeiro et al. (2015). O método baseia-se na redução do NBT pelo ânion superóxido, formando cristais de formazana, cuja quantidade formada é diretamente proporcional à produção de ânion superóxido na amostra. Os homogenatos teciduais, preparados em solução de EDTA 2 mM, foram incubados com NBT a 37 °C durante 1 hora. Em seguida, a formazana formada foi solubilizada com hidróxido de potássio (KOH) 2 M e

dimetilsulfóxido (DMSO), sendo a absorbância determinada por espectrofotometria em 600 nm. Os resultados foram expressos em DO/mg de proteína.

4.8.4 *Determinação das concentrações de glutathiona reduzida (GSH)*

A concentração de glutathiona reduzida (GSH) foi determinada conforme o método descrito por Rahman et al. (2007). O ensaio baseia-se na reação da GSH com o ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB), formando o cromóforo amarelo 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB), cuja intensidade é proporcional à concentração de GSH na amostra. A absorbância foi determinada por espectrofotometria em 412 nm, e os resultados foram expressos em μmol de GSH/mg de proteína.

4.8.5 *Determinação da atividade da catalase (CAT)*

A atividade da catalase (CAT) foi determinada conforme o método descrito por Aebi et al. (1974). O ensaio baseia-se na decomposição enzimática do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), cuja velocidade de consumo foi monitorada por espectrofotometria. As leituras foram realizadas em 240 nm, em intervalos de 15 segundos, durante 1 minuto e 30 segundos. Os resultados foram expressos em mM/mg de proteína.

4.8.6 *Determinação da atividade da superóxido dismutase (SOD)*

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi determinada conforme o método descrito por Kono (1978). O ensaio baseia-se na inibição da redução do nitroblue tetrazolium (NBT) pelo ânion superóxido, gerado pela reação entre o cloridrato de hidroxilamina e o oxigênio molecular. A mistura reacional foi composta por tampão carbonato de sódio (50 mM; pH 10,2), nitroblue tetrazolium (NBT; 96 μM), Triton X-100 (0,6%) e cloridrato de hidroxilamina (20 mM; pH 6,0). A absorbância foi determinada por espectrofotometria em 560 nm, com leituras realizadas a cada 15 segundos, durante 2 minutos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína (Kono, 1978).

4.8.7 *Determinação do poder antioxidante redutor férrico (FRAP)*

O poder antioxidante redutor férrico foi determinado pelo método Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP), conforme descrito por Pinho-Ribeiro et al. (2015). O ensaio baseia-se na capacidade dos antioxidantes presentes na amostra

em reduzir o complexo férrico Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tripiridil-s-triazina) à sua forma ferrosa (Fe^{2+} -TPTZ), formando um complexo de coloração azul. As amostras foram incubadas com o reagente FRAP recém-preparado a 37 °C, durante 30 minutos, e a absorbância foi determinada por espectrofotometria em 595 nm. Foi utilizada curva padrão de Trolox (0,02-20 nmol) para quantificação dos resultados, que foram expressos em nmol de equivalentes de Trolox/mg de proteína.

4.8.8 *Determinação da capacidade antioxidante total (ABTS)*

A capacidade antioxidante total foi determinada pelo ensaio do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), conforme descrito por Pinho-Ribeiro et al. (2015). O método baseia-se na capacidade dos antioxidantes presentes na amostra em sequestrar o radical cátion $\text{ABTS}^{\bullet+}$, promovendo redução da intensidade da coloração da solução. Após incubação da amostra com a solução de ABTS diluída durante 6 minutos, a absorbância foi determinada por espectrofotometria em 730 nm. Os resultados foram expressos em nmol de equivalentes de Trolox/mg de proteína.

4.9 **Avaliação da infiltração de células inflamatórias**

A infiltração de células inflamatórias nos tecidos estudados foi avaliada indiretamente por meio da determinação das atividades da mieloperoxidase (MPO) e da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG), utilizadas como marcadores de infiltração de neutrófilos e macrófagos, respectivamente.

4.9.1 *Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)*

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi determinada conforme o método descrito por Bradley et al. (1982). O ensaio baseia-se na oxidação da o-dianisidina catalisada pela MPO na presença de peróxido de hidrogênio, formando um composto cromógeno cuja intensidade é proporcional à atividade da enzima. Para isso, os tecidos foram homogeneizados em tampão fosfato contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), centrifugados e os sobrenadantes incubados com o-dianisidina. A absorbância foi determinada por espectrofotometria em 450 nm. A atividade da MPO foi expressa como número de neutrófilos/mg de tecido, com base em curva padrão de neutrófilos.

4.9.2 Determinação da atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG)

A atividade da N-acetil- β -D-glicosaminidase (NAG) foi determinada conforme adaptação do método descrito por Pinho-Ribeiro et al. (2015). O ensaio baseia-se na hidrólise do substrato 4-nitrofenil-N-acetil- β -D-glicosaminida, liberando p-nitrofenol, cuja intensidade de coloração é proporcional à atividade enzimática. Para isso, 20 μ L do sobrenadante obtido no ensaio de MPO foram incubados com HTAB e o substrato cromogênico a 37 °C durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de tampão glicina (pH 10,6) e a absorbância determinada por espectrofotometria em 400 nm. A atividade da NAG foi expressa como número de macrófagos/mg de tecido, com base em curva padrão de macrófagos.

4.10 Análise Estatística

Inicialmente, foi realizada análise descritiva dos dados, seguida da verificação dos pressupostos para a aplicação de testes paramétricos. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias, pelo teste de Levene. Para as variáveis que atenderam aos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias, as comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância de duas vias (Two-way ANOVA), considerando como fatores independentes a condição de ninhada (NL ou SL) e o tratamento (veículo ou vitC), bem como a interação ninhada $\times$ tratamento. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram inicialmente submetidas à transformação logarítmica. Quando a transformação permitiu o atendimento aos pressupostos do modelo, os dados transformados foram analisados por Two-way ANOVA, mantendo-se os mesmos fatores e sua interação. Para as variáveis que permaneceram inadequadas aos pressupostos da ANOVA após a transformação, foram empregados Modelos Lineares Generalizados (Generalized Linear Models - GENLIN), com distribuição de probabilidade e função de ligação selecionadas de acordo com as características e a distribuição da variável dependente.

Em todas as análises fatoriais, foram avaliados os efeitos principais da condição de ninhada e do tratamento, bem como a interação entre esses fatores. Quando identificada interação estatisticamente significativa, os efeitos principais não foram interpretados isoladamente, sendo realizadas comparações entre os grupos com ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os resultados das análises

baseadas em ANOVA foram reportados pela estatística F, com os respectivos graus de liberdade e valores de p, enquanto os resultados obtidos pelos modelos GENLIN foram apresentados pela estatística Wald χ^2 , acompanhada dos respectivos graus de liberdade e valores de p. Os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM), e o nível de significância estatística adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 *Avaliação dos efeitos da suplementação com vitamina C no período peripuberal em ratos com supernutrição neonatal por redução do tamanho da ninhada.*

5.1.1 Avaliação morfofisiológica

No DPN 60, houve interação entre os os fatores ninhada (NL ou SL) e tratamento (veículo ou vitamina C) no ganho de peso corporal, sendo observado aumento deste parâmetro nos grupos SL-veículo e NL-vitC em comparação do grupo NL-veículo (Figura 2A; Tabela 1). Em relação à ingestão alimentar, não houve interação entre os fatores; entretanto, os animais SL apresentaram menor ingestão alimentar em comparação aos animais NL, enquanto a suplementação com vitC promoveu redução dessa análise, independentemente da condição nutricional neonatal, ou seja, no grupo NL e SL (Figura 2B; Tabela 1). Para a eficiência energética, também foi observada interação entre os fatores, também evidenciada por aumento deste parâmetro nos grupos SL-veículo e NL-vitC em comparação do grupo NL-veículo (Figura 2C; Tabela 1).

No DPN 90, não foi observada interação entre os fatores para o ganho de peso corporal. Entretanto, os animais SL apresentaram maior ganho de peso em comparação aos animais NL, enquanto a suplementação com vitC reduziu este parâmetro, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 2A; Tabela 1). Em relação a ingestão alimentar, houve interação entre os fatores, caracterizada pela redução nos animais NL suplementados com vitC, em relação ao grupo NL-veículo, e aumento nos animais SL tratados com vitC, comparado ao grupo SL-veículo (Figura 2B; Tabela 1). Em relação à eficiência energética, não foi observada interação entre os fatores; contudo, os animais SL apresentaram maior eficiência energética quando comparados aos animais NL, independentemente do tratamento (Figura 2C; Tabela 1).

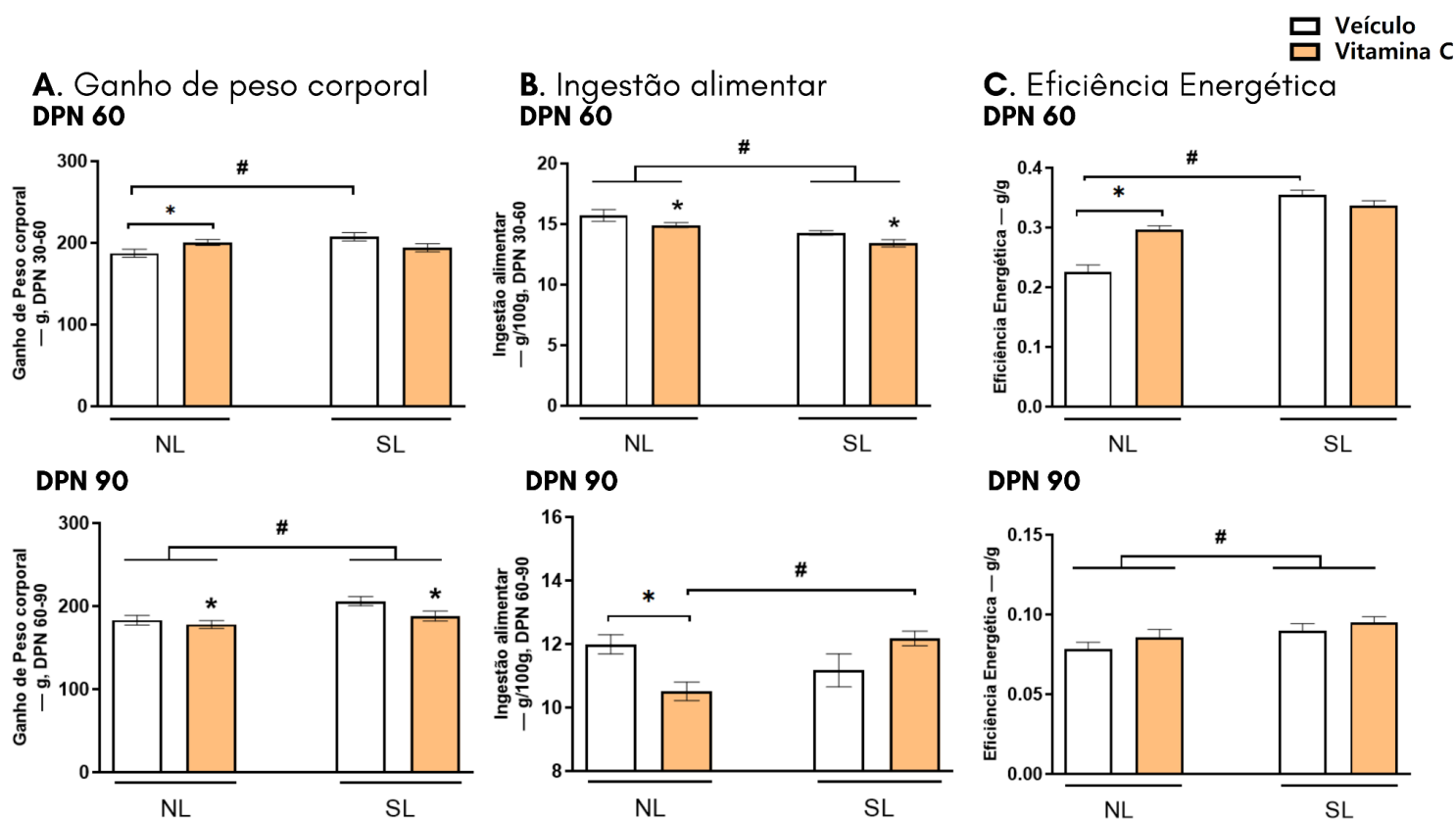


Figura 2. Perfil morfométrico e parâmetros relacionados ao balanço energético dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Ganho de peso corporal durante o período experimental (DPN 30-60 e DPN 60-90) (A), ingestão alimentar (g/100 g de peso corporal) (B) e eficiência energética (g/g) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=12-15$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

No DPN 60 foi observada interação entre os fatores para o Índice de Lee. Houve aumento no índice de Lee no grupo SL-veículo em relação ao respectivo grupo NL, e a suplementação com vitC promoveu aumento desse índice nos animais NL (Figura 3A; Tabela 1). Em relação aos tecidos adiposos, os animais SL apresentaram maior peso relativo dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal em comparação aos animais NL, independentemente do tratamento (Figura 3B, C; Tabela 1).

No DPN 90, os animais SL apresentaram maior Índice de Lee em relação aos animais NL, sem efeito da suplementação com vitC (Figura 3A; Tabela 1). Os animais SL apresentaram maior peso relativo dos tecidos adiposos epididimal e retroperitoneal, e a suplementação com vitC reduziu esses parâmetros, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 3B, C; Tabela 1).

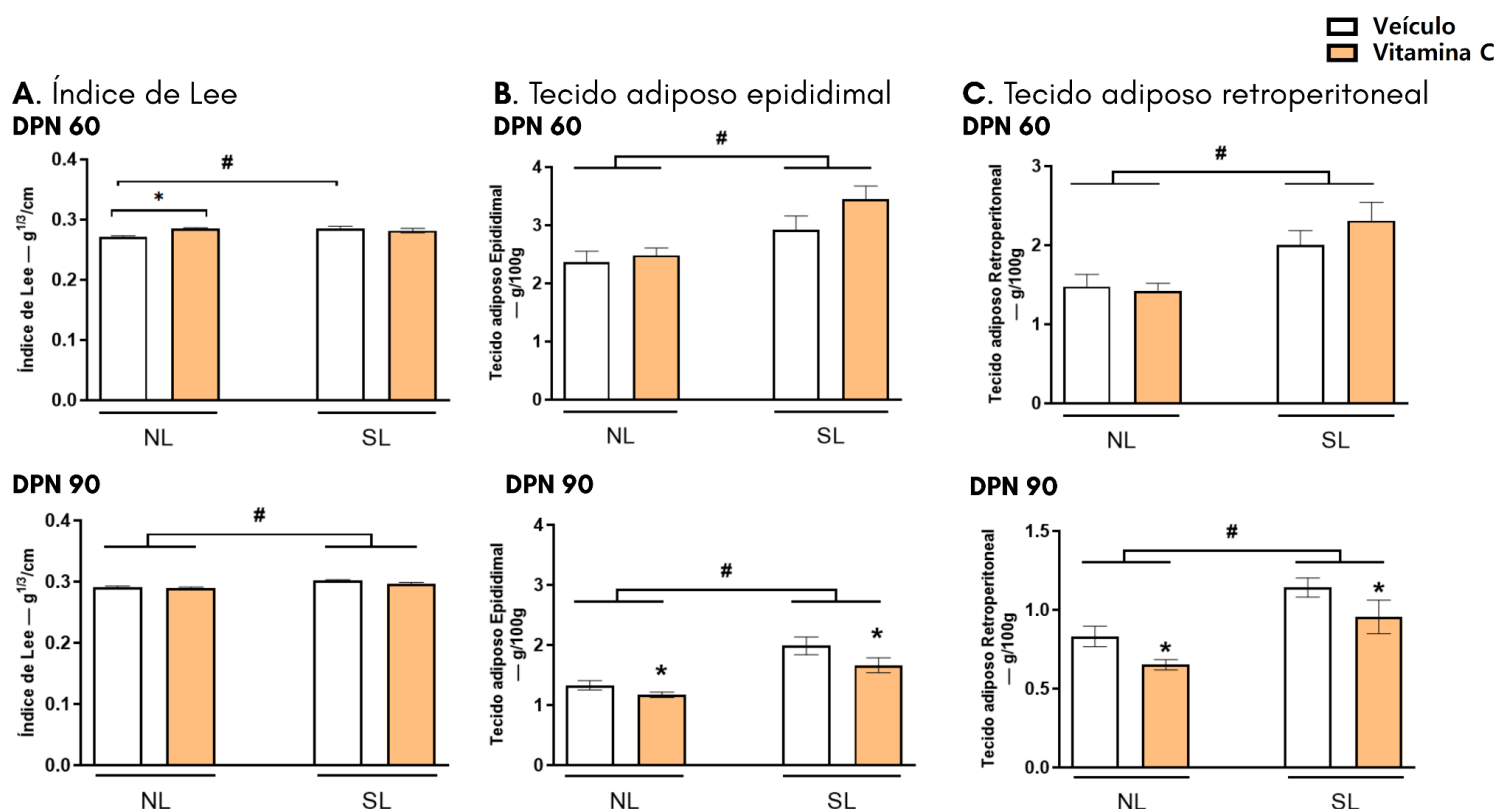


Figura 3. Índice de Lee e adiposidade dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Índice de Lee (g^{1/3}/cm) (A), peso relativo do tecido adiposo epididimal (g/100 g de peso corporal) (B) e peso relativo do tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g de peso corporal) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=12–15/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.1.2 Avaliação da Homeostase glicêmica

No DPN 60, foi observada interação na glicemia plasmática. Os animais SL-veículo apresentaram maiores concentrações plasmáticas de glicose em comparação aos animais NL-veículo, e a suplementação com vitC reduziu este parâmetro nos animais SL, mas ainda apresentaram maiores valores de glicemia, comparado aos animais NL-veículo (Figura 4A; Tabela 1). Para a concentração plasmática de insulina, não foi observado efeito da condição nutricional neonatal; entretanto, a suplementação com vitC aumentou as concentrações de insulina plasmática, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 4B; Tabela 1). Também foi observada interação entre os fatores para a área sob a curva (AUC) do GTT. Os animais SL-veículo apresentaram maior AUC em comparação aos animais NL-veículo, enquanto a suplementação com vitC reduziu esse parâmetro

nos animais SL (Figura 4C; Tabela 1). No DPN 90, apesar da interação entre os fatores, não foi observada diferença na glicemia plasmática entre os grupos (Figura 4A; Tabela 1). Em relação à concentração plasmática de insulina, os animais SL apresentaram menores concentrações em comparação aos animais NL, independentemente da suplementação com vitC (Figura 4B; Tabela 1). Não foi observada interação entre os fatores para a AUC do GTT, porém, os animais SL apresentaram maior AUC em relação aos animais NL, enquanto a suplementação com vitC reduziu a intolerância à glicose, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 4C; Tabela 1).

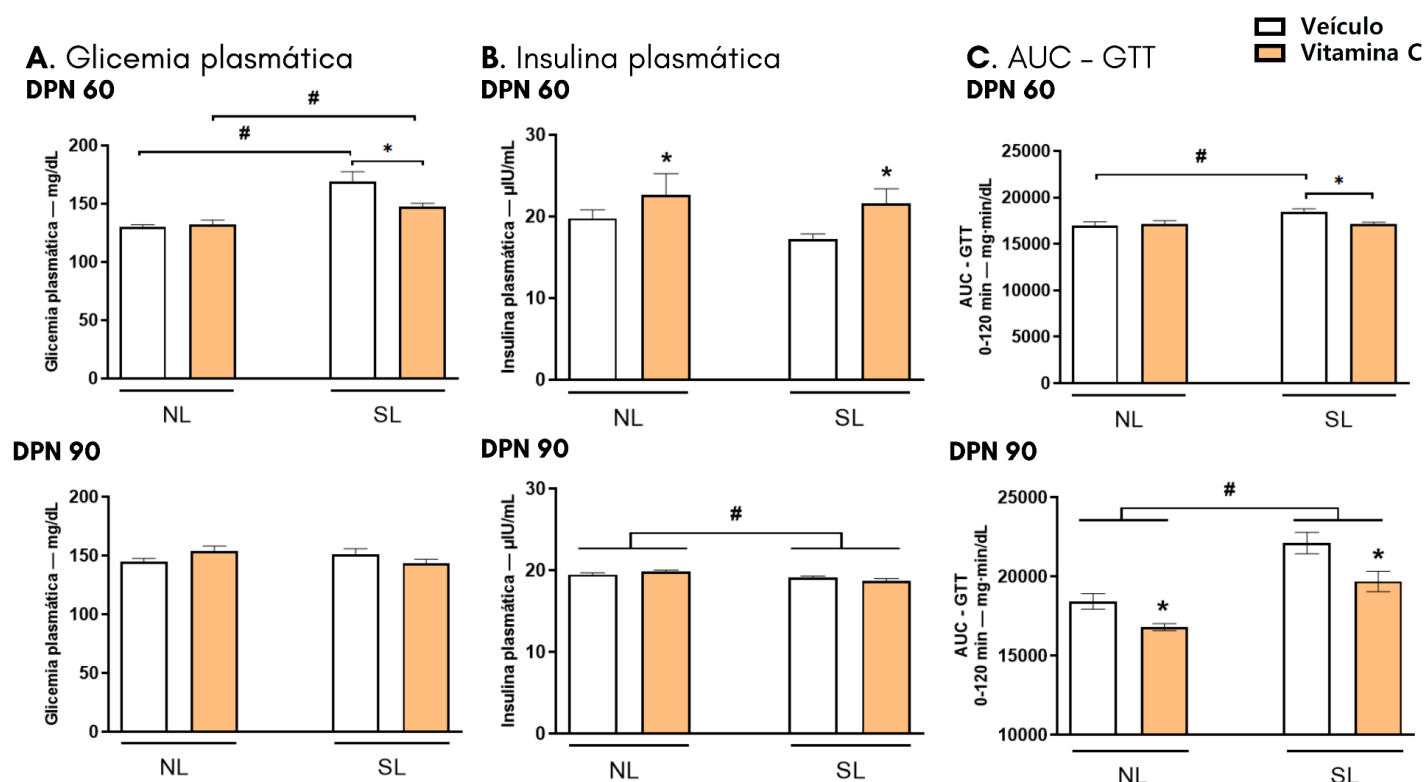


Figura 4. Perfil glicêmico dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Glicemia plasmática (mg/dL) (A), insulina plasmática (µU/mL) (B) e área sob a curva (AUC) do teste de tolerância à glicose (GTT) (mg·min/dL) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=10–15/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

No DPN 60, os índices TyG, HOMA-IR e HOMA-β não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 5A, B, C; Tabela 1). Já no DPN 90, o índice TyG e o HOMA-IR foram maiores nos animais SL em comparação aos animais NL, sem

efeitos da vitC (Figura 5A, B; Tabela 1). Em contrapartida, para o índice HOMA- β , os animais SL apresentaram menores valores quando comparados aos animais NL, enquanto a suplementação com vitC elevou este parâmetro, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 5C; Tabela 1).

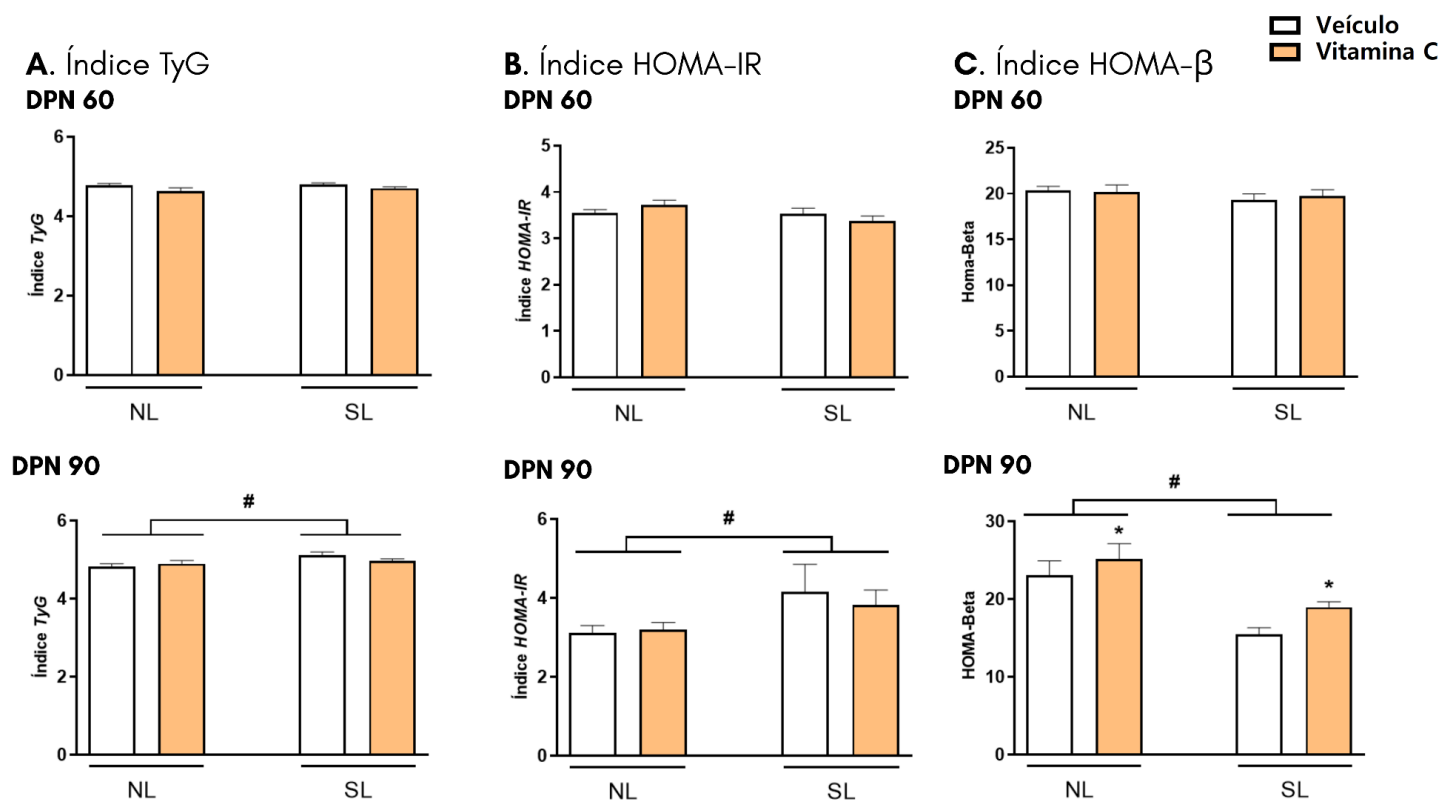


Figura 5. Índices indiretos de sensibilidade à insulina dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Índice TyG (A), índice HOMA-IR (B) e índice HOMA- β (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=9–15/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.1.3 Avaliação do perfil lipídico

No DPN 60, não foi observada interação entre os fatores para as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, porém os animais SL apresentaram valores menores em comparação aos animais NL, sem efeito da vitC (Figura 6A; Tabela 1). As concentrações plasmáticas de colesterol total não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 6B; Tabela 1). Em relação ao colesterol-HDL, não houve interação entre os fatores; entretanto, a suplementação com vitC promoveu aumento desse parâmetro, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 6C; Tabela 1). No DPN 90, também não foi observada interação entre os

fatores para as concentrações plasmáticas de triacilgliceróis, porém, diferentemente do protocolo anterior, os animais SL apresentaram valores maiores em comparação aos animais NL, sem efeito da vitC (Figura 6A; Tabela 1). Para o colesterol total, foi observada interação entre os fatores, caracterizada pela redução das concentrações plasmáticas apenas nos animais NL suplementados com vitC, em relação aos grupos NL-veículo e SL-vitC (Figura 6B; Tabela 1). Da mesma forma, foi observada interação para o colesterol-HDL, caracterizada por sua redução nos animais NL suplementados com vitC e SL-veículo, em relação ao grupo NL-veículo (Figura 6C; Tabela 1).

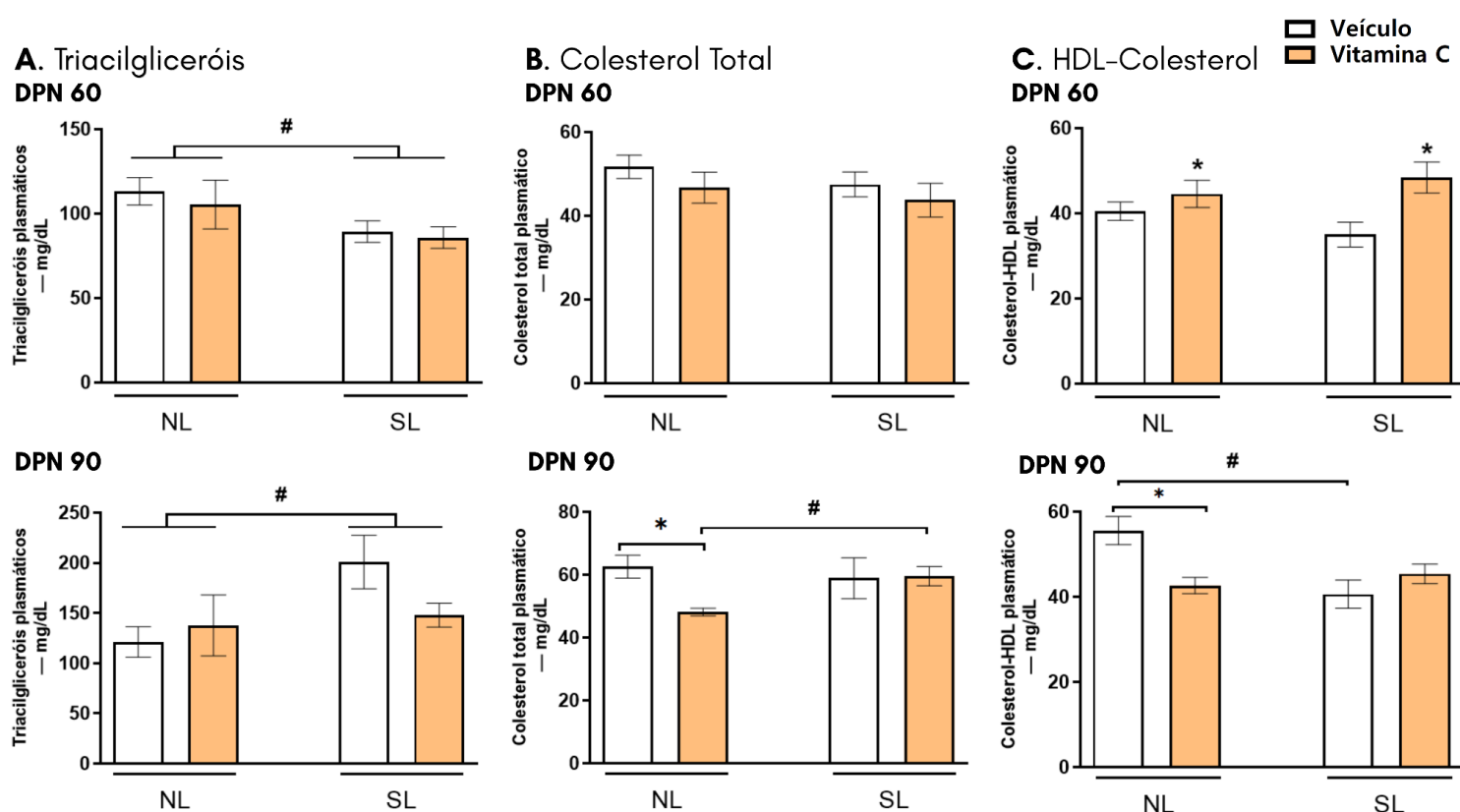


Figura 6. Perfil lipídico dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Triacilgliceróis plasmáticos (mg/dL) (A), colesterol total plasmático (mg/dL) (B) e HDL-colesterol plasmático (mg/dL) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=9–15/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

Tabela 1. Descrição estatística referente ao perfil morfofisiológico, à homeostase glicêmica e sensibilidade à insulina, e ao perfil lipídico plasmático dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC, avaliados nos DPN 60 e 90. Os valores correspondem à estatística de teste (F ou Wald χ^2) e ao respectivo valor de p, obtidos pela análise two-way ANOVA, considerando os fatores: condição nutricional neonatal (SL ou NL) e tratamento (vitC ou veículo), bem como a interação. Para as variáveis cujos resíduos não atenderam aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk)

e/ou de homogeneidade de variâncias (teste de Levene), foi utilizado modelo linear generalizado, sendo a estatística de teste expressa como Wald χ^2 . $p < 0,05$.

Variável	DPN 60 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação	DPN 90 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação
<i>Perfil morfofisiológico</i>						
Ganho de peso corporal	$F_{1,43}=1.99$ $p=0.165$	$F_{1,43}=0.001$ $p=0.976$	$F_{1,43}=7.61$ $p=0.008$	$F_{1,49}=8.68$ $p=0.005$	$F_{1,49}=4.33$ $p=0.043$	$F_{1,49}=1.34$ $p=0.252$
Ingestão alimentar	$F_{1,46}=19.62$ $p<0.0001$	$F_{1,46}=6.43$ $p=0.015$	$F_{1,46}=0.23$ $p=0.637$	$F_{1,48}=1.49$ $p=0.228$	$F_{1,48}=0.48$ $p=0.494$	$F_{1,48}=12.97$ $p=0.001$
Eficiência energética	Wald $\chi^2_1=68.92$ $p<0.0001$	Wald $\chi^2_1=9.82$ $p=0.002$	Wald $\chi^2_1=21.783$ $p<0.0001$	$F_{1,49}=5.61$ $p=0.022$	$F_{1,49}=1.91$ $p=0.174$	$F_{1,49}=0.43$ $p=0.837$
Índice de Lee	$F_{1,42}=4.13$ $p=0.049$	$F_{1,42}=2.95$ $p=0.093$	$F_{1,42}=9.45$ $p=0.004$	$F_{1,47}=27.93$ $p<0.0001$	$F_{1,47}=3.50$ $p=0.067$	$F_{1,47}=0.96$ $p=0.332$
Tecido adiposo retroperitoneal	$F_{1,42}=9.91$ $p=0.003$	$F_{1,42}=0.035$ $p=0.852$	$F_{1,42}=0.370$ $p=0.546$	Wald $\chi^2_1=22.20$ $p<0.0001$	Wald $\chi^2_1=8.03$ $p=0.005$	Wald $\chi^2_1=0.192$ $p=0.661$
Tecido adiposo epididimal	Wald $\chi^2_1=8.46$ $p=0.004$	Wald $\chi^2_1=0.709$ $p=0.400$	Wald $\chi^2_1=0.398$ $p=0.528$	$F_{1,47}=35.20$ $p<0.0001$	$F_{1,47}=5.55$ $p=0.023$	$F_{1,47}=0.33$ $p=0.571$
<i>Homeostase glicêmica</i>						
AUC GTT	$F_{1,39}=3.70$ $p=0.062$	$F_{1,39}=2.46$ $p=0.125$	$F_{1,39}=4.48$ $p=0.041$	$F_{1,47}=38.78$ $p<0.0001$	$F_{1,47}=14.73$ $p<0.0001$	$F_{1,47}=0.56$ $p=0.457$
Glicemia plasmática	Wald $\chi^2_1=47.09$ $p<0.001$	Wald $\chi^2_1=4.87$ $p=0.027$	Wald $\chi^2_1=7.91$ $p=0.005$	Wald $\chi^2_1=0.34$ $p=0.561$	Wald $\chi^2_1=0.012$ $p=0.914$	Wald $\chi^2_1=4.82$ $p=0.028$
Insulina plasmática	Wald $\chi^2_1=1.89$ $p=0.17$	Wald $\chi^2_1=6.96$ $p=0.008$	Wald $\chi^2_1=0.45$ $p=0.504$	$F_{1,35}=12.71$ $p=0.001$	$F_{1,35}=0.001$ $p=0.976$	$F_{1,35}=2.77$ $p=0.105$
Índice TyG	$F_{1,46}=0.01$ $p=0.922$	$F_{1,46}=2.06$ $p=0.158$	$F_{1,46}=0.02$ $p=0.896$	$F_{1,37}=5.42$ $p=0.025$	$F_{1,37}=0.37$ $p=0.546$	$F_{1,37}=2.25$ $p=0.142$
Índice HOMA-IR	$F_{1,34}=3.17$ $p=0.084$	$F_{1,34}=0.1$ $p=0.752$	$F_{1,34}=1.6$ $p=0.215$	Wald $\chi^2_1=8.04$ $p=0.005$	Wald $\chi^2_1=0.09$ $p=0.767$	Wald $\chi^2_1=0.504$ $p=0.478$
Índice HOMA-Beta	$F_{1,34}=1.34$ $p=0.255$	$F_{1,34}=0.03$ $p=0.864$	$F_{1,34}=0.25$ $p=0.624$	$F_{1,34}=24.34$ $p<0.0001$	$F_{1,34}=5.2$ $p=0.029$	$F_{1,34}=0.87$ $p=0.357$
<i>Perfil lipídico</i>						
Triacilgliceróis	$F_{1,46}=4.97$ $p=0.031$	$F_{1,46}=0.344$ $p=0.560$	$F_{1,46}=0.49$ $p=0.825$	$F_{1,39}=7.01$ $p=0.012$	$F_{1,39}=0.42$ $p=0.519$	$F_{1,39}=1.44$ $p=0.237$
Colesterol total	$F_{1,48}=1.09$ $p=0.302$	$F_{1,48}=1.61$ $p=0.210$	$F_{1,48}=0.03$ $p=0.856$	Wald $\chi^2_1=1.71$ $p=0.191$	Wald $\chi^2_1=4.66$ $p=0.031$	Wald $\chi^2_1=5.47$ $p=0.019$
Colesterol-HDL	$F_{1,47}=0.76$ $p=0.784$	$F_{1,47}=8.31$ $p=0.006$	$F_{1,47}=2.39$ $p=0.129$	$F_{1,42}=4.37$ $p=0.043$	$F_{1,42}=1.91$ $p=0.174$	$F_{1,42}=9.12$ $p=0.004$

Após a avaliação morfofisiológica e metabólica sistêmica, foram avaliados os efeitos da suplementação com vitC sobre o metabolismo tecidual,

homeostase redox e infiltração inflamatória no fígado, músculo gastrocnêmio e músculo sóleo de animais com supernutrição lactacional.

5.2 Avaliação do metabolismo tecidual, homeostase redox e infiltração inflamatória:

Fígado

5.2.1 Metabolismo tecidual

No metabolismo lipídico hepático, neste primeiro momento (DPN 60), não foi observada interação entre os fatores para as quantificações do conteúdo de triacilgliceróis e colesterol. Os animais SL apresentaram maiores concentrações de triacilgliceróis e menores concentrações de colesterol total, em comparação aos animais NL, sem efeito da suplementação com vitC (Figura 7A, B; Tabela 2).

No DPN 90, também não foi observada interação entre os fatores para o conteúdo hepático de triacilgliceróis. Os animais SL apresentaram aumento de conteúdo hepático de triacilgliceróis em comparação aos animais NL, enquanto a suplementação com vitC promoveu sua redução, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 7A; Tabela 2). A quantidade hepática de colesterol não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 7B; Tabela 2).

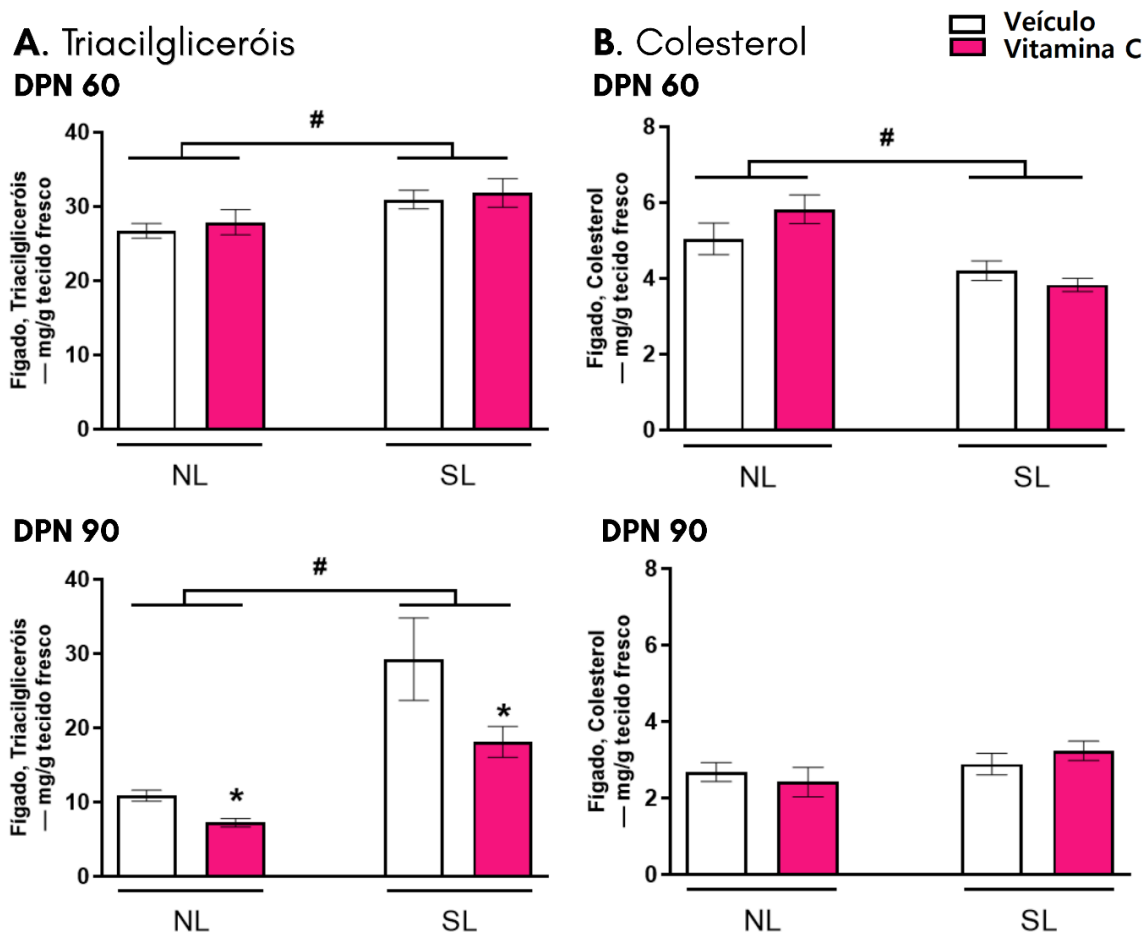


Figura 7. Metabolismo lipídico hepático dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração hepática de triacilgliceróis (mg/g de tecido fresco) (A) e colesterol (mg/g de tecido fresco) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=8–12/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

Em relação ao metabolismo glicídico hepático, no DPN 60, foi observada interação entre os fatores para o conteúdo de glicogênio, evidenciada pelo seu aumento nos grupos SL-veículo e NL suplementados com vitC, em comparação ao grupo NL-veículo, enquanto nos animais SL a suplementação promoveu sua redução, em relação a esses dois grupos em que houve o aumento (Figura 8A; Tabela 2). Da mesma forma, foi observada interação para a quantidade hepática de glicose, caracterizada pela sua redução nos animais NL suplementados com viiC, ao passo que houve aumento do conteúdo hepático de glicose nos animais SL-vitC, em relação ao respectivo grupo NL (Figura 8B; Tabela 2). No DPN 90, também foram

observadas interações entre os fatores para as quantificações de glicogênio e glicose. Para o glicogênio, houve aumento no grupo SL-veículo, em relação ao NL-veículo, e a suplementação com vitC promoveu sua redução nos animais SL, comparado aos seus respectivos controles (Figura 8A; Tabela 2). O conteúdo hepático de glicose foi aumentado e reduzido nos grupos NL e SL, respectivamente, em relação aos respectivos veículos, sendo menor no SL-vitC em relação ao NL-vitC (Figura 8B; Tabela 2).

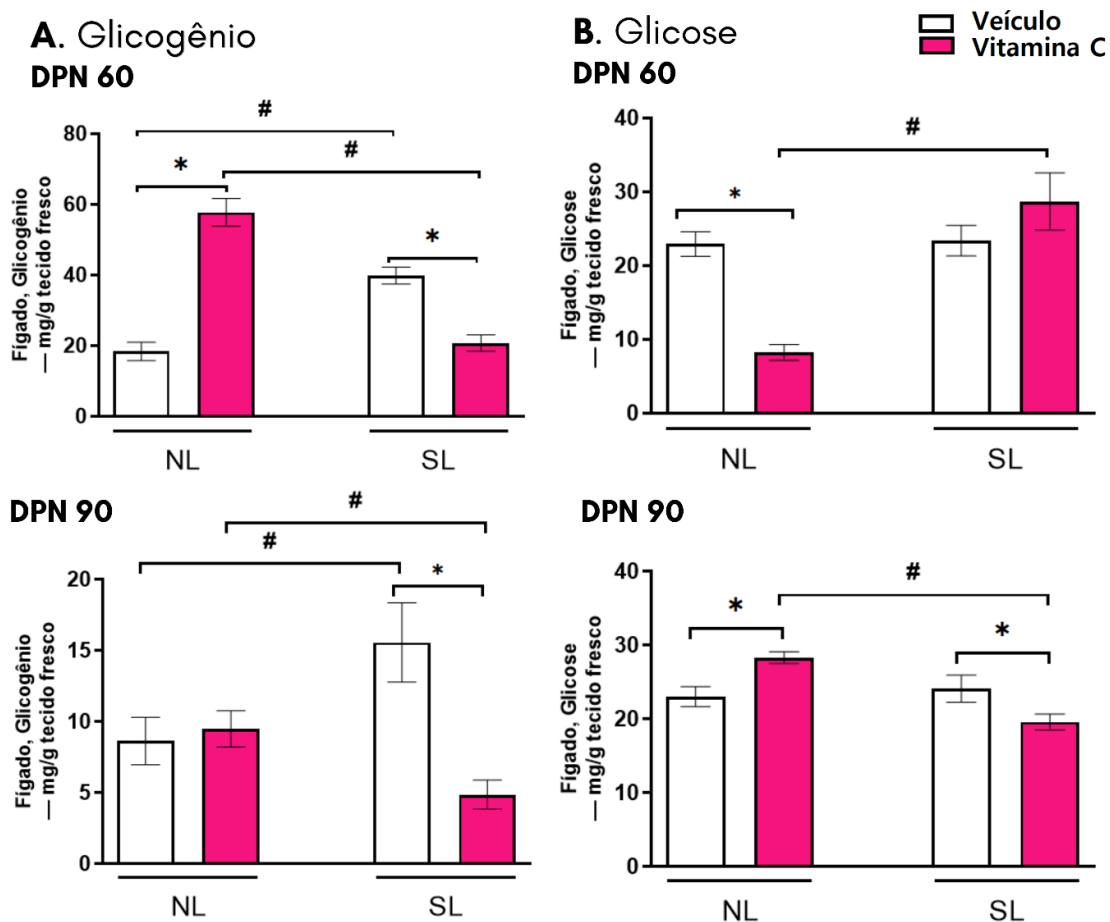


Figura 8. Metabolismo glicídico hepático dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração hepática de glicogênio (mg/g de tecido fresco) (A) e glicose (mg/g de tecido fresco) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=8-12$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

5.2.2 Infiltração inflamatória

No DPN 60, não foi observada interação entre os fatores para as atividades hepáticas de MPO e NAG. Também não houve efeito da condição

nutricional neonatal sobre a atividade dessas enzimas; entretanto, a suplementação com vitC promoveu redução das atividades de MPO e NAG (Figura 9; Tabela 2). No DPN 90, também não foi observada interação entre os fatores para as atividades hepáticas de MPO e NAG. Para ambas as enzimas, os animais SL apresentaram menor atividade em comparação aos animais NL, independentemente da suplementação com vitC (Figura 9; Tabela 2).

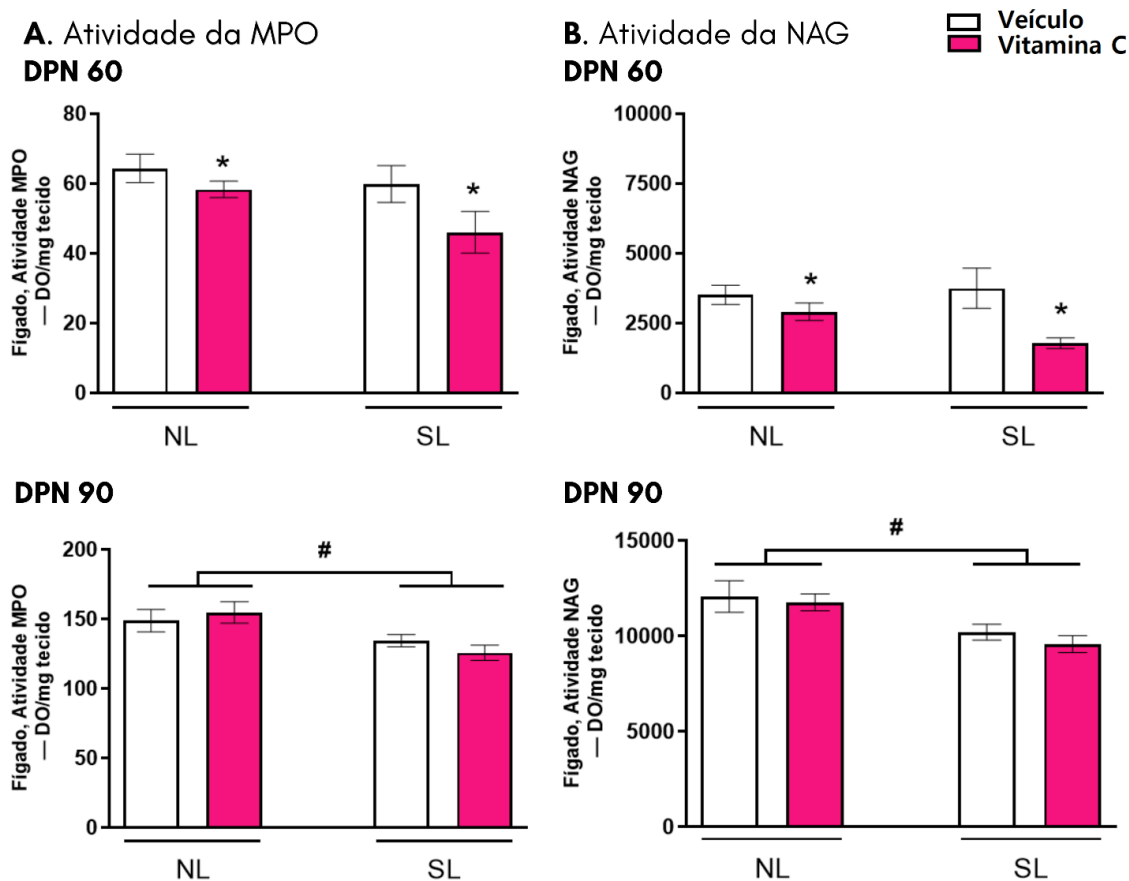


Figura 9. Infiltração inflamatória hepática dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Atividade hepática da mieloperoxidase (MPO) (U/mg de tecido) (A) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) (U/mg de tecido) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=9–10/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.2.3 Marcadores pró-oxidativos

No DPN 60, não foi observada interação entre os fatores para a peroxidação lipídica hepática, avaliada pelos níveis de MDA, nem para a redução do NBT. Os animais SL apresentaram maiores níveis de MDA em comparação aos animais NL, independentemente da suplementação com vitC (Figura 10A; Tabela 2).

Para a redução do NBT, não foram observados efeitos da condição nutricional neonatal, da vitC ou da interação entre os fatores (Figura 10C; Tabela 2). Em relação à carbonilação proteica (PCO), foi observada interação, caracterizada pelo seu aumento apenas nos animais NL suplementados com vitC, em comparação ao respectivo veículo (Figura 10B; Tabela 2). No DPN 90, não foram observados efeitos da condição nutricional neonatal, da suplementação com vitC ou da interação entre os fatores para as avaliações hepáticas de peroxidação lipídica (MDA), PCO e redução do NBT (Figura 10; Tabela 2).

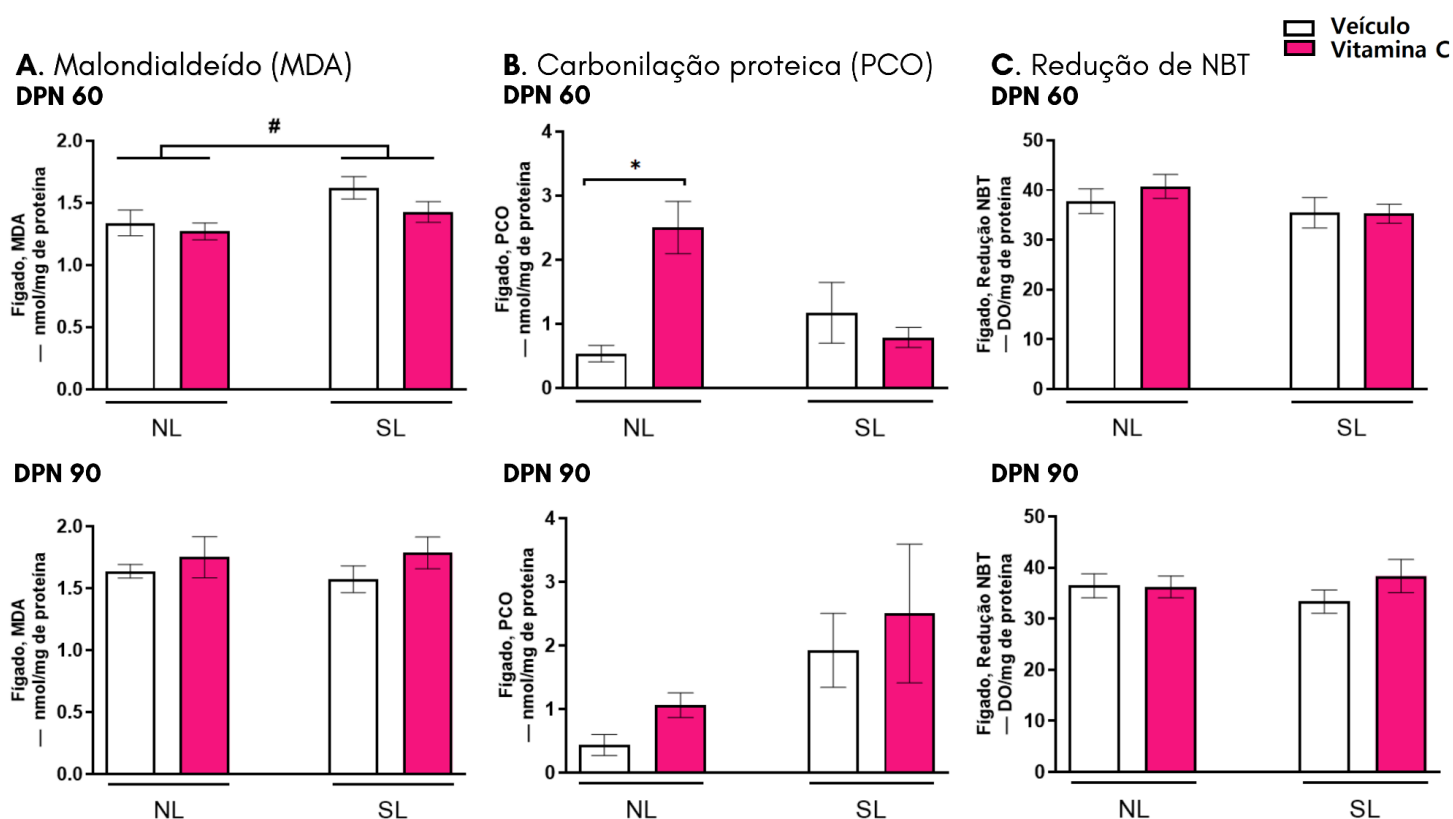


Figura 10. Marcadores pró-oxidantes hepáticos dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração hepática de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína) (A), carbonilação proteica (PCO) (nmol/mg de proteína) (B) e redução do nitroblue tetrazolium (NBT) (DO/mg de tecido) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=8-12$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

5.2.4 Avaliação de defesas antioxidantes

Em relação ao sistema de defesas antioxidantes, no DPN 60, não foi observada interação entre os fatores para as concentrações hepáticas de GSH, nem

para as atividades da SOD e da catalase. Em relação à atividade da SOD e catalase, não foram observados efeitos da condição nutricional neonatal ou da suplementação com vitC (Figura 11A, B; Tabela 2). As concentrações de GSH foram maiores nos animais SL em comparação aos animais NL, sendo aumentadas pela suplementação com vitC, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 11C; Tabela 2). No DPN 90, foi observada interação entre os fatores na atividade da SOD, caracterizada pelo aumento apenas nos animais NL suplementados com vitC, comparados ao NL-veículo e SL-vitC (Figura 11A; Tabela 2). Em relação à atividade da CAT, não houve interação; entretanto, a suplementação com vitC promoveu seu aumento (Figura 11B; Tabela 2). Foi observada interação entre os fatores para as concentrações hepáticas de GSH, caracterizada pela sua redução nos animais NL suplementados com vitC, comparados ao NL-veículo e SL-vitC (Figura 11C; Tabela 2).

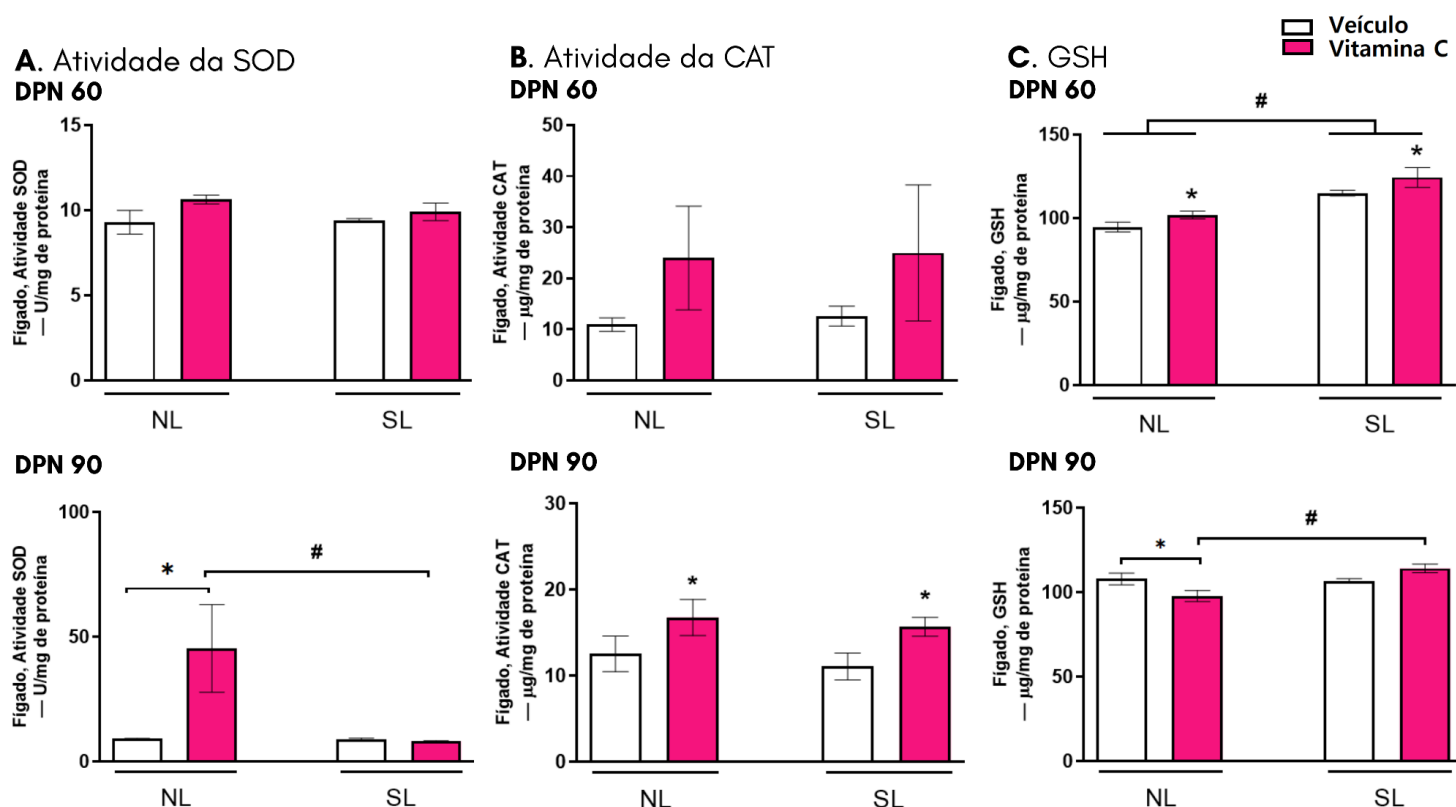


Figura 11. Defesas antioxidantes hepáticas dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Atividade hepática da superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) (A), atividade da catalase (CAT) (µg/mg de proteína) (B) e concentração de glutathiona reduzida (GSH) (nmol/mg de proteína) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=10/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

Em relação a capacidade antioxidante do fígado, no DPN 60, não foi observada interação entre os fatores para o poder redutor férrico (FRAP), nem efeitos da condição nutricional neonatal ou da suplementação com vitC (Figura 12A; Tabela 2). Relativamente à capacidade antioxidante total (ABTS), foi observada interação entre os fatores, caracterizada pela sua redução apenas nos animais SL tratados com vitC, em relação aos seus controles (Figura 12B; Tabela 2). No DPN 90, não houve interação para o FRAP. Entretanto, os animais SL apresentaram aumento em comparação aos animais NL, sem efeito da suplementação com vitC (Figura 12A; Tabela 2). O ABTS não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 12B; Tabela 2).

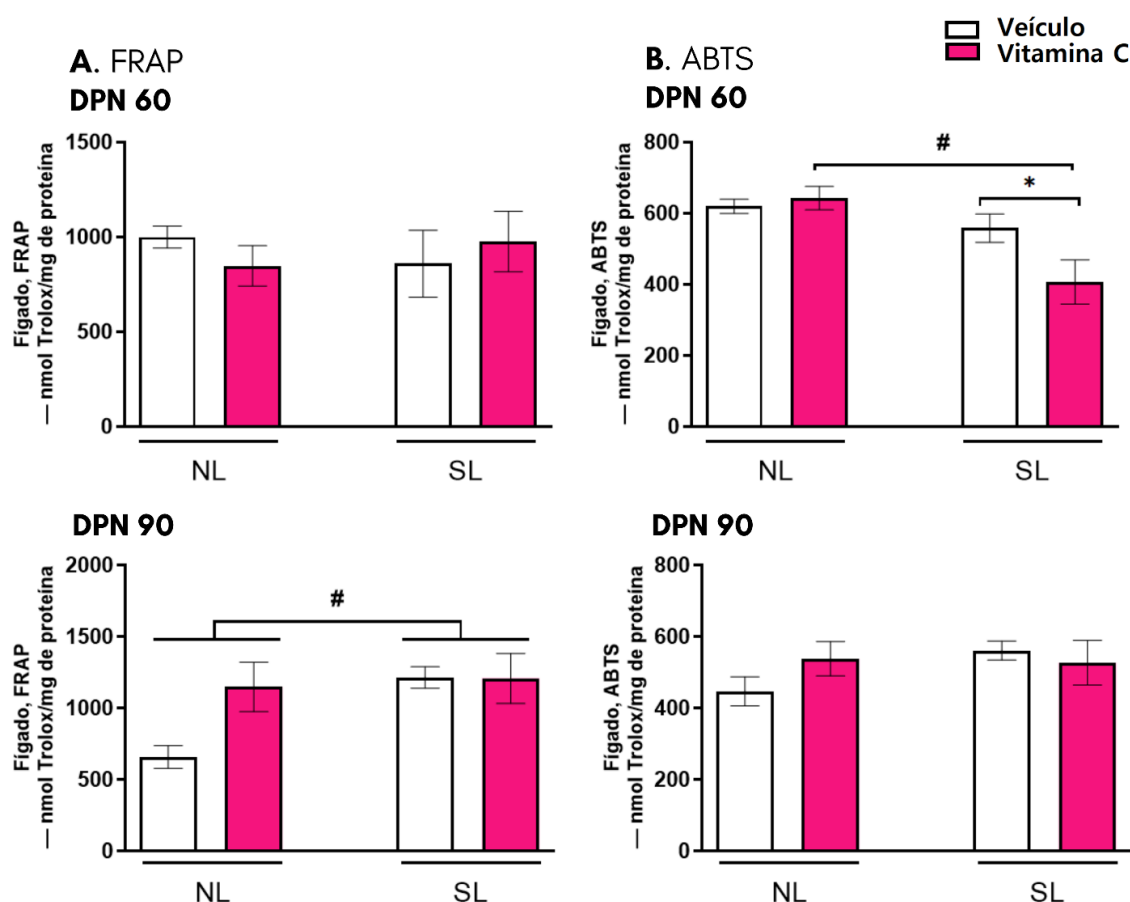


Figura 12. Capacidade antioxidante hepática dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Poder antioxidante redutor férrico (FRAP) (nmol Trolox/mg de proteína) (A) e capacidade antioxidante total determinada pelo método ABTS (nmol Trolox/mg de proteína) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=10-12$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

Tabela 2. Descrição estatística referente ao metabolismo tecidual, à infiltração inflamatória, aos marcadores pró-oxidativos e às defesas antioxidantes no fígado dos grupos NL-Veículo, NL-vitC,

SL-Veículo e SL-vitC, avaliados nos DPN 60 e 90. Os valores correspondem à estatística de teste (F ou Wald χ^2) e ao respectivo valor de p, obtidos pela análise two-way ANOVA, considerando os fatores: condição nutricional neonatal (SL ou NL) e tratamento (vitC ou veículo), bem como a interação. Para as variáveis cujos resíduos não atenderam aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e/ou de homogeneidade de variâncias (teste de Levene), foi utilizado modelo linear generalizado, sendo a estatística de teste expressa como Wald χ^2 . $p < 0,05$.

Variável	DPN 60 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação	DPN 90 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação
Fígado						
<i>Metabolismo tecidual</i>						
Triacilglicerol	F_{1,34}=7.26 p=0.011	F _{1,34} =0.45 p=0.506	F _{1,34} =0.007 p=0.932	F_{1,31}=44.59 p<0.0001	F_{1,31}=9.14 p=0.005	F _{1,31} =0.11 p=0.918
Colesterol	F_{1,31}=19.74 p<0.0001	F _{1,31} =0.33 p=0.571	F _{1,31} =3.582 p=0.068	F _{1,33} =2.99 p=0.093	F _{1,33} =0.02 p=0.888	F _{1,33} =1.06 p=0.311
Glicogênio	F_{1,38}=7.00 p=0.012	F_{1,38}=12.03 p=0.001	F_{1,38}=99.37 p<0.0001	F _{1,26} =0.12 p=0.732	F_{1,26}=7.82 p=0.01	F_{1,26}=13.93 p=0.001
Glicose	F_{1,38}=18.02 p<0.0001	F _{1,38} =3.59 p=0.066	F_{1,38}=16.51 p<0.0001	F _{1,28} =8.22 p=0.08	F _{1,28} =0.082 p=0.776	F_{1,28}=13.56 p=0.001
<i>Infiltração inflamatória</i>						
Atividade MPO	F _{1,32} =3.51 p=0.07	F_{1,32}=4.98 p=0.033	F _{1,32} =0.77 p=0.386	F_{1,32}=11.48 p=0.002	F _{1,32} =0.12 p=0.734	F _{1,32} =1.54 p=0.224
Atividade NAG	F _{1,29} =3.08 p=0.09	F_{1,29}=8.49 p=0.007	F _{1,29} =2.24 p=0.146	F_{1,33}=13.12 p=0.001	F _{1,33} =0.58 p=0.452	F _{1,33} =0.29 p=0.593
<i>Marcadores pró-oxidativos</i>						
Malondialdeído (MDA)	F _{1,23} =6.20 p=0.020	F _{1,23} =2.24 p=0.148	F _{1,23} =0.53 p=0.476	F _{1,36} =0.01 p=0.909	F _{1,36} =1.81 p=0.187	F _{1,36} =0.17 p=0.684
Carbonilação proteica (PCO)	Wald χ^2_1 =0.350 p=0.554	Wald χ^2_1 =3.252 p=0.071	Wald χ^2_1=9.342 p=0.002	F _{1,26} =3.59 p=0.069	F _{1,26} =2.71 p=0.112	F _{1,26} =1.62 p=0.215
Redução de NBT	F _{1,31} =2.57 p=0.119	F _{1,31} =0.33 p=0.570	F _{1,31} =0.42 p=0.524	F _{1,31} =0.04 p=0.847	F _{1,31} =0.88 p=0.355	F _{1,31} =1.07 p=0.309
<i>Defesa antioxidante</i>						
Glutathiona reduzida (GSH)	F _{1,27} =35.30 p<0.0001	F _{1,27} =5.32 p=0.029	F _{1,27} =0.09 p=0.769	F_{1,35}=7.04 p=0.012	F _{1,35} =0.23 p=0.637	F_{1,35}=9.50 p=0.004
Superóxido dismutase (SOD)	Wald χ^2_1 =0.325 p=0.568	Wald χ^2_1 =3.075 p=0.079	Wald χ^2_1 =0.583 p=0.445	Wald χ^2_1=18.28 p<0.0001	Wald χ^2_1=13.56 p<0.0001	Wald χ^2_1=16.62 p<0.0001
Catalase (CAT)	F _{1,28} =.084 p=0.774	F _{1,28} =.707 p=0.407	F _{1,28} =.006 p=0.940	F _{1,34} =0.52 p=0.4740	F_{1,34}=6.22 p=0.018	F _{1,34} =0.01 p=0.918
Poder redutor férrico (FRAP)	F _{1,34} =.002 p=0.962	F _{1,34} =.019 p=0.891	F _{1,34} =1.08 p=0.307	F_{1,31}=5.53 p=0.026	F _{1,31} =3.41 p=0.075	F _{1,31} =3.60 p=0.067
Capacidade antioxidante (ABTS)	F _{1,34} =12.36 p=0.001	F _{1,34} =2.33 p=0.136	F _{1,34} =4.25 p=0.047	F _{1,31} =1.24 p=0.274	F _{1,31} =0.38 p=0.541	F _{1,31} =1.85 p=0.184

5.3 Avaliação do metabolismo tecidual, homeostase redox e infiltração inflamatória:

Músculo Gastrocnêmio

Em relação à massa relativa do músculo gastrocnêmio, no DPN 60 não foi observada interação entre os fatores avaliados. Houve efeito da condição nutricional neonatal, onde os animais SL apresentaram menor massa relativa do músculo gastrocnêmio em comparação aos animais NL, sem efeitos da vitC (Figura 13; Tabela 3). No DPN 90, não houve interação entre os fatores, tampouco efeitos da condição nutricional neonatal ou da suplementação com vitC sobre essa análise (Figura 13; Tabela 3).

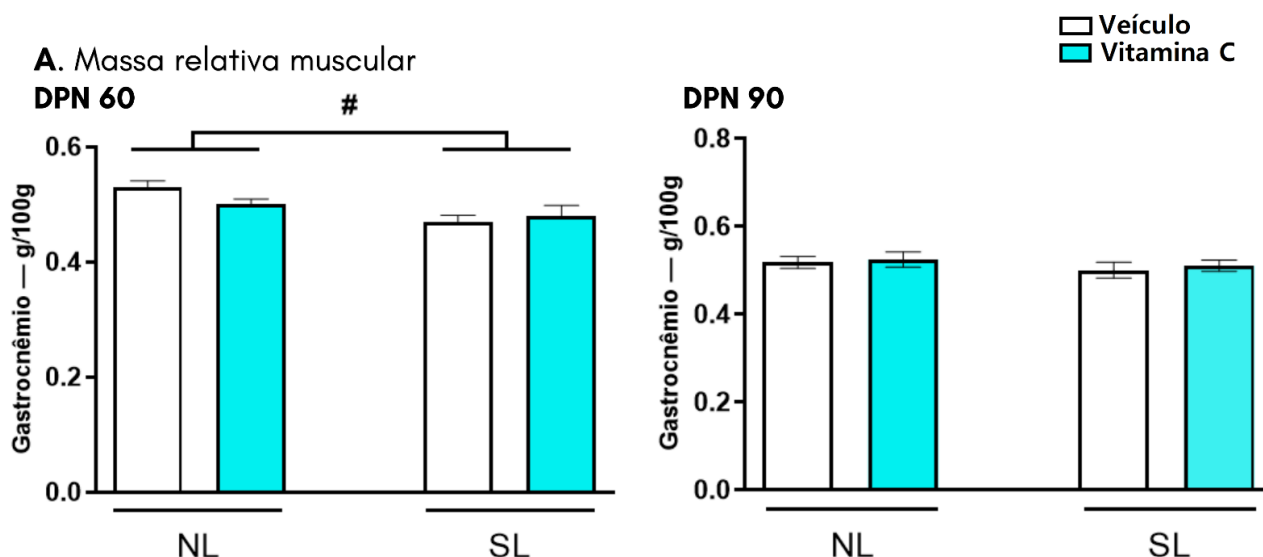


Figura 13. Massa relativa do músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Massa relativa do músculo gastrocnêmio (g/100 g de peso corporal) (A). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=13–15/grupo). * $p < 0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p < 0,05$ para comparação entre ninhadas.

5.3.1 Metabolismo tecidual

Em relação ao metabolismo lipídico no respectivo músculo, no DPN 60, foi observada interação para a quantidade de triacilgliceróis, evidenciada por aumento nos animais SL-veículo e NL suplementados com vitC, em comparação aos NL-veículo (Figura 14A; Tabela 3). Em relação à quantidade de colesterol, também foi observada interação entre os fatores, demonstrada pela maior quantidade de colesterol no grupo SL-veículo, em comparação ao grupo NL-veículo, e pela sua

redução induzida pela vitC nos animais SL. (Figura 14B; Tabela 3). No DPN 90, não foi observada interação entre os fatores para a quantificação de triacilgliceróis. Também não houve efeito da condição nutricional neonatal; entretanto, a suplementação com vitC promoveu seu aumento (Figura 14A; Tabela 3). Já em relação ao colesterol, foi observada interação, caracterizada pelo seu aumento apenas nos animais SL suplementados com vitC, em relação aos controles (Figura 14B; Tabela 3).

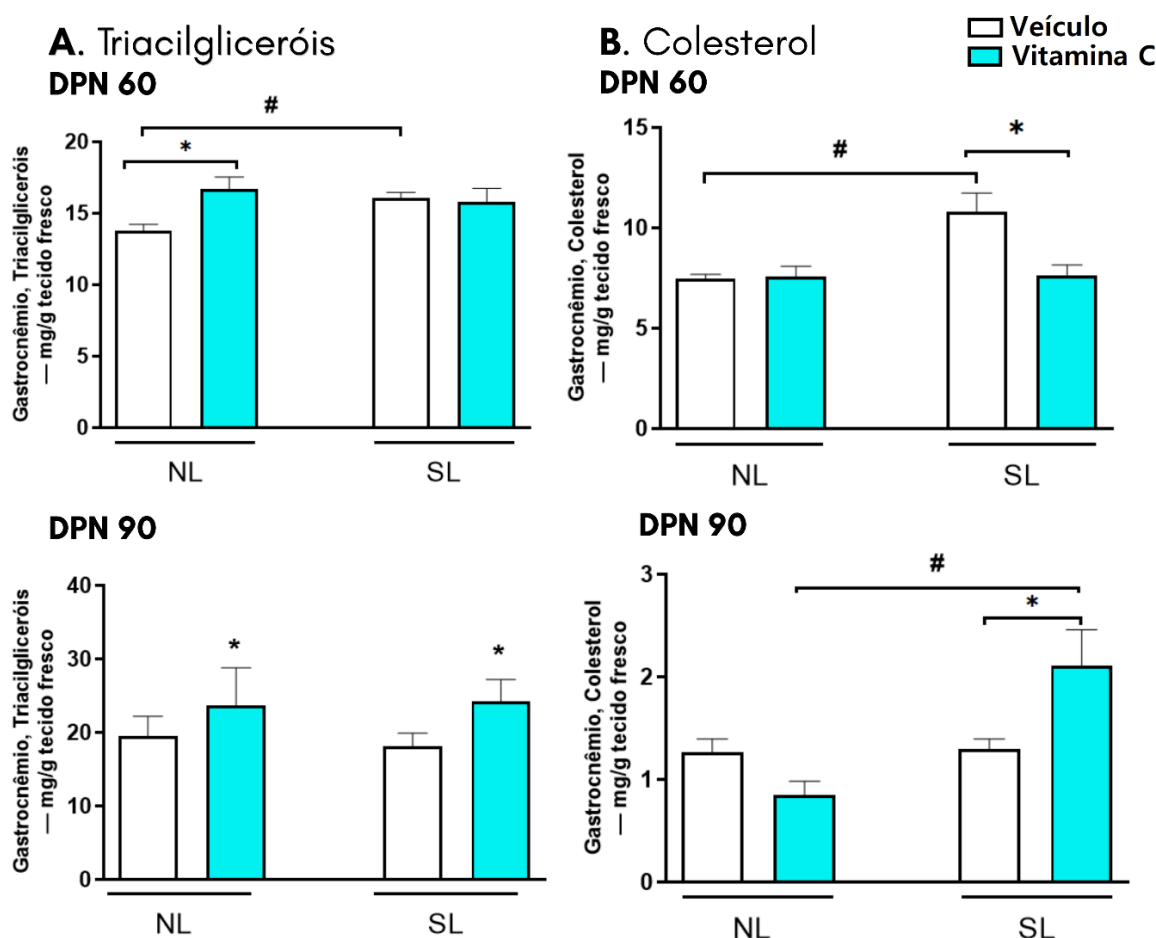


Figura 14. Metabolismo lipídico do músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração de triacilgliceróis (mg/g de tecido fresco) (A) e colesterol (mg/g de tecido fresco) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=8–12/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

Já em relação ao metabolismo glicídico no respectivo músculo, no DPN 60, foi observada interação entre os fatores para a quantificação de glicogênio, caracterizada pelo seu aumento apenas nos animais NL suplementados com vitC, em comparação aos grupos NL-veículo e SL-vitC (Figura 15A; Tabela 3). Em relação

à glicose, não foi observada interação ou efeito da condição nutricional neonatal; entretanto, a suplementação com vitC promoveu seu aumento (Figura 15B; Tabela 3). No DPN 90, não houve diferença entre os grupos experimentais em relação a essas duas análises (Figura 15A, B; Tabela 3).

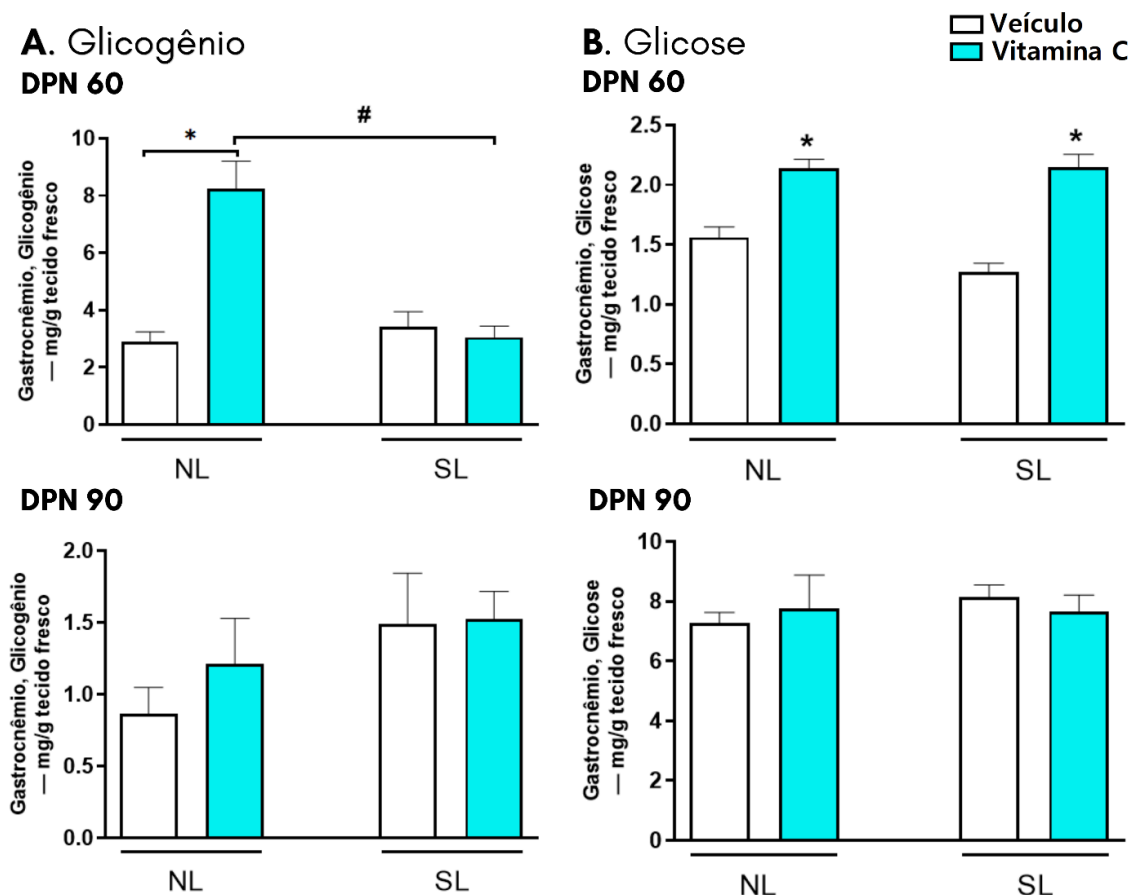


Figura 15. Metabolismo glicídico do músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração de glicogênio (mg/g de tecido fresco) (A) e glicose (mg/g de tecido fresco) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=8–12/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.3.2 Infiltração inflamatória

No DPN 60, não foram observados efeitos da condição nutricional neonatal ou suplementação, e interação entre os fatores para as atividades de MPO e NAG no músculo gastrocnêmio (Figura 16A; Tabela 3). Em relação à atividade de NAG, não foram observados efeitos da suplementação ou interação; entretanto, os animais SL apresentaram menor atividade dessa enzima em comparação aos animais NL (Figura 16B; Tabela 3).

No DPN 90, foi observada interação para as atividades de MPO e NAG. Para a atividade de MPO, a suplementação com vitC promoveu sua redução nos animais SL, em comparação aos seus controles (Figura 16A; Tabela 3). Da mesma forma, para a atividade de NAG, a vitC promoveu seu aumento nos animais SL, comparados aos animais SL-veículo e NL-vitC. Além disso, houve redução do NAG no grupo SL-veículo em relação ao NL-veículo (Figura 16B; Tabela 3).

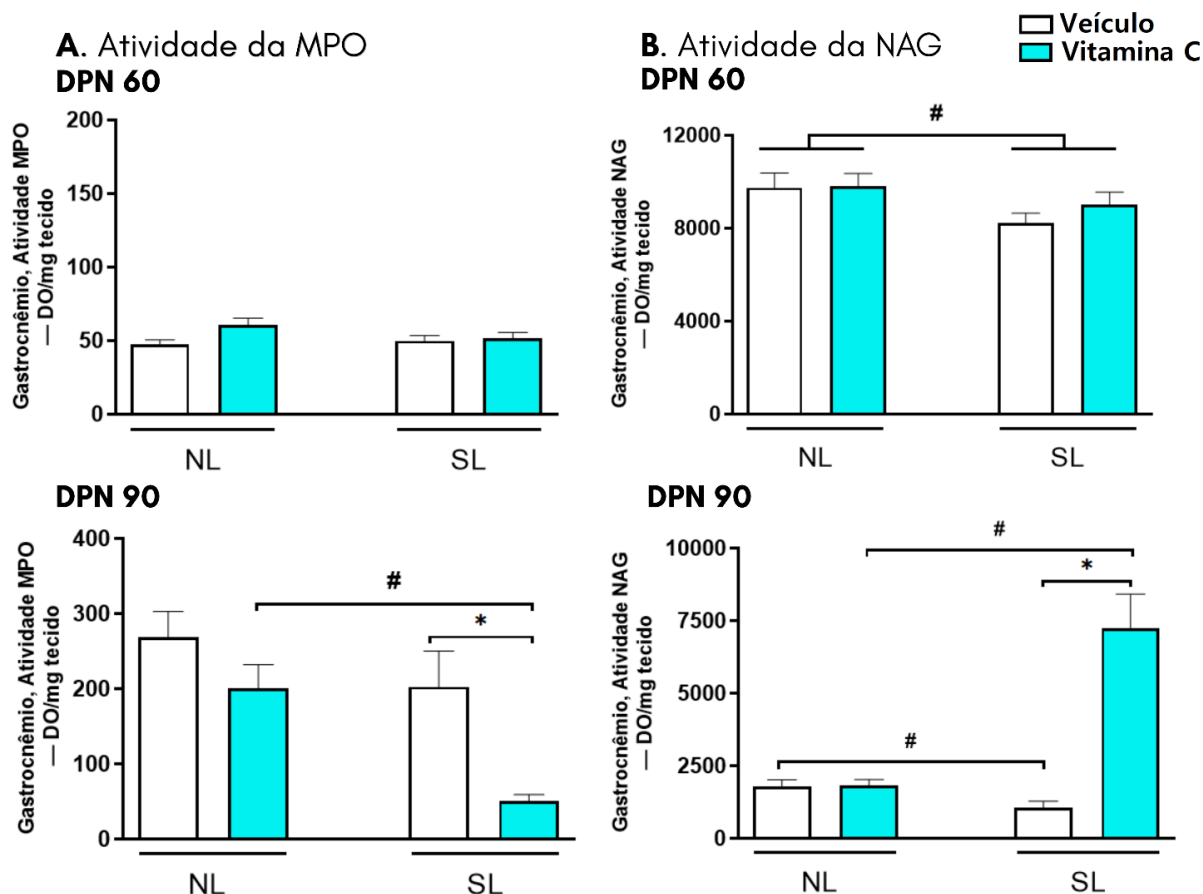


Figura 16. Infiltração inflamatória do músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Atividade da mieloperoxidase (MPO) (U/mg de tecido) (A) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) (U/mg de tecido) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=9–10/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.3.3 Marcadores pró-oxidativos

No DPN 60, não foi observada interação para os níveis de MDA, PCO e redução do NBT no músculo gastrocnêmio. As concentrações de MDA e PCO não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 17A, B; Tabela 3). Em relação à

redução do NBT, os animais SL apresentaram aumento em comparação aos animais NL, sendo também aumentados pela suplementação com vitC (Figura 17C; Tabela 3). No DPN 90, também não foi observada interação para os marcadores pró-oxidativos avaliados. As concentrações de MDA não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 17A; Tabela 3). Em relação à PCO, os animais SL apresentaram aumento em comparação aos animais NL, sem efeito da vitC (Figura 17B; Tabela 3). Por outro lado, a redução do NBT foi menor nos animais SL em comparação aos animais NL, sem efeito da vitC (Figura 17C; Tabela 3).

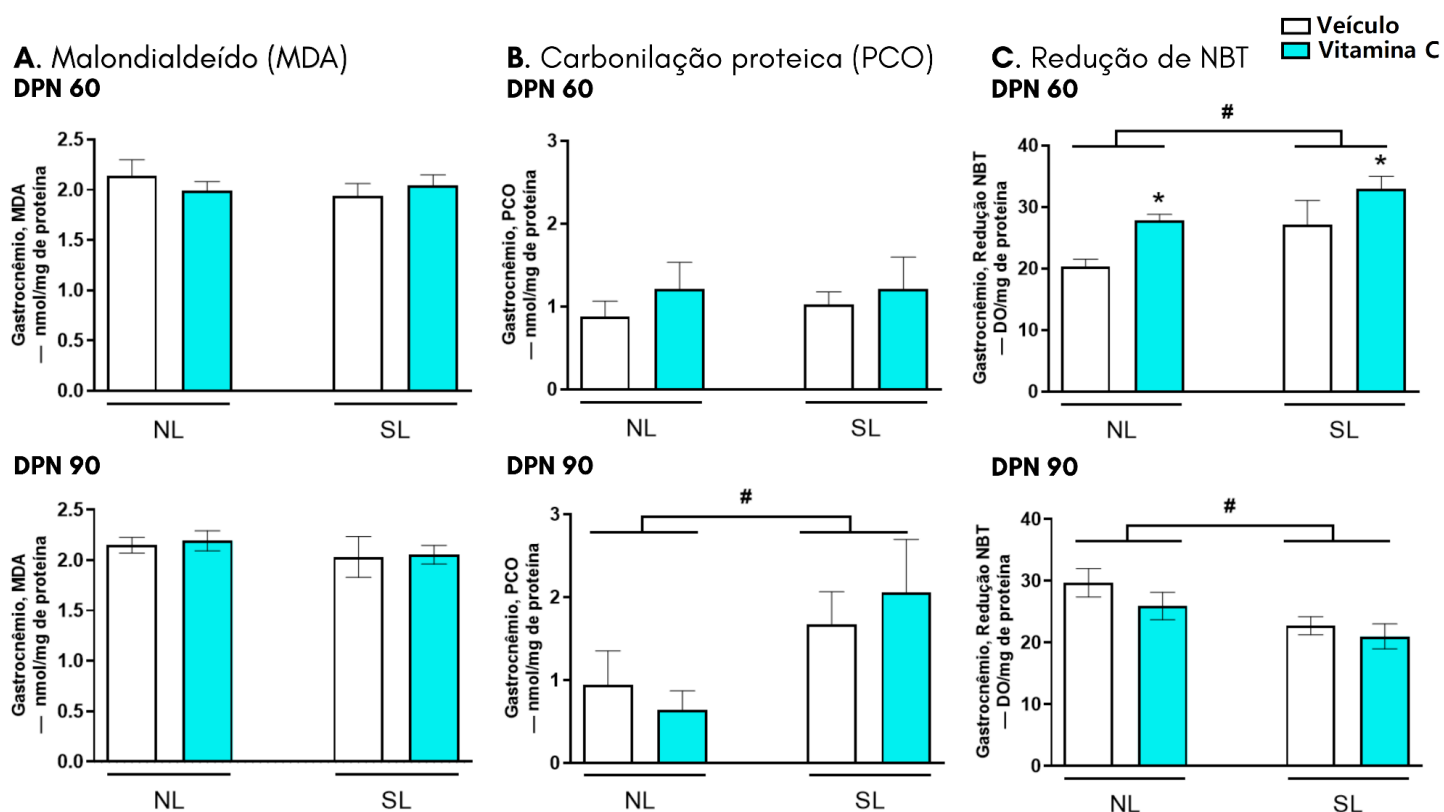


Figura 17. Marcadores pró-oxidantes do músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína) (A), carbonilação proteica (PCO) (nmol/mg de proteína) (B) e redução do nitroblue tetrazolium (NBT) (DO/mg de tecido) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=8-12$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

5.3.4 Avaliação das defesas antioxidantes

Em relação ao sistema de defesas antioxidantes, no DPN 60, não foi observada interação para as concentrações de GSH e atividade da SOD. A atividade da SOD não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 18A; Tabela 3). Em

relação à atividade da catalase, foi observada interação, caracterizada pela sua redução nos animais SL suplementados com vitC, em relação ao seu respectivo veículo (Figura 18B; Tabela 3). A concentração de GSH foi maior nos animais SL em comparação aos animais NL, sem efeito da vitC (Figura 18C; Tabela 3). No DPN 90, não foram observadas diferenças na atividade da SOD entre os grupos experimentais (Figura 18A; Tabela 3). Foi observada interação para as concentrações de GSH e para a atividade da CAT. Essa interação foi evidenciada pelo aumento da atividade da CAT e GSH nos animais SL-vitC, comparados aos seus controles (Figura 18B, C; Tabela 3).

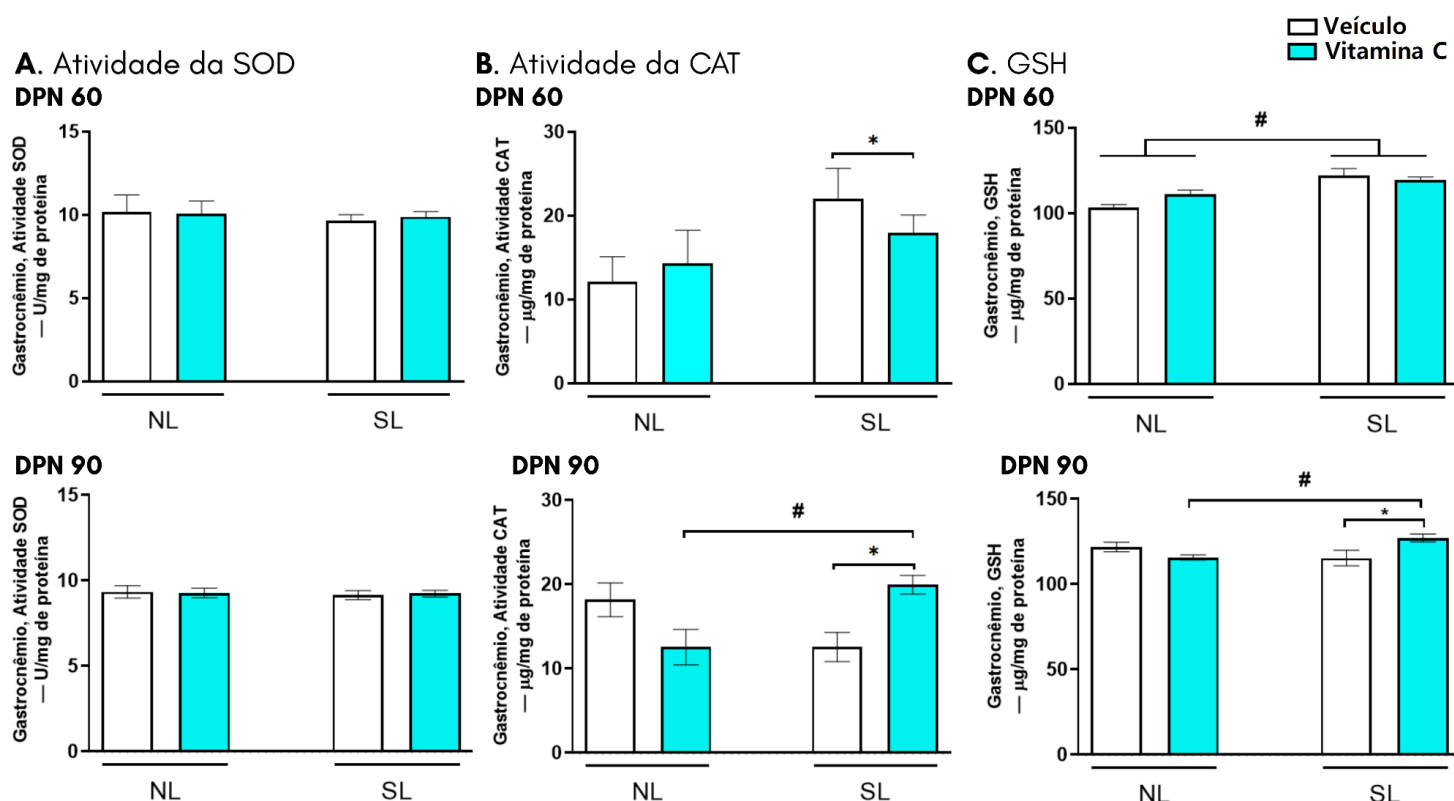


Figura 18. Defesas antioxidantes do músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Atividade da superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) (A), atividade da catalase (CAT) (µg/mg de proteína) (B) e concentração de glutathiona reduzida (GSH) (nmol/mg de proteína) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=10/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

Em relação à capacidade antioxidante, no DPN 60, não foi observada interação para o FRAP, nem para o ABTS. O FRAP apresentou efeito da vitC, caracterizado pela sua redução, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 19A; Tabela 3). Em relação ao ABTS, foi observado efeito da condição nutricional neonatal, evidenciado pelo seu aumento nos animais SL em

comparação aos animais NL (Figura 19B; Tabela 3). No DPN 90, não foi observada interação entre os fatores para o FRAP nem para o ABTS. O FRAP não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 19A; Tabela 3). Em relação ao ABTS, os animais SL apresentaram sua redução em comparação aos animais NL, e a suplementação com vitC promoveu seu aumento, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 19B; Tabela 3).

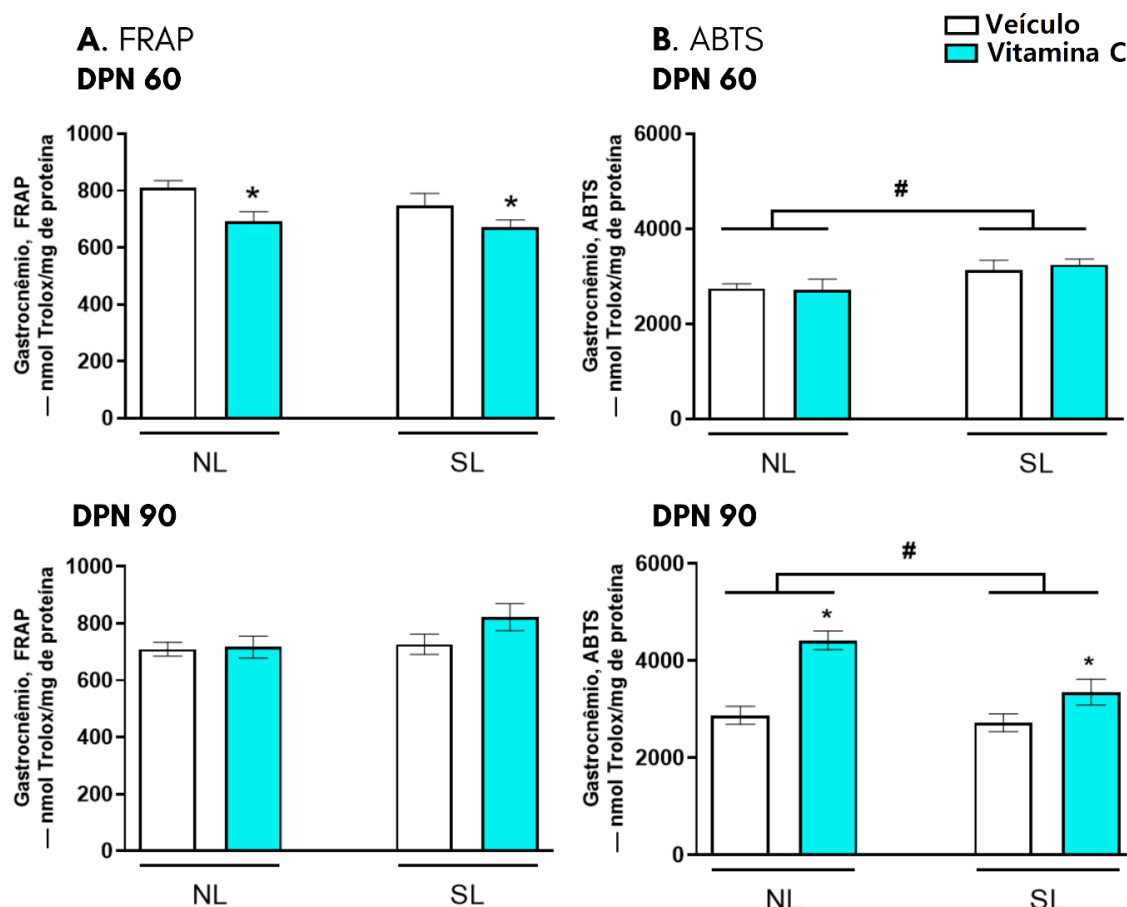


Figura 19. Capacidade antioxidante do músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Poder antioxidante redutor férrico (FRAP) (nmol Trolox/mg de proteína) (A) e capacidade antioxidante total determinada pelo método ABTS (nmol Trolox/mg de proteína) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=10-12$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

Tabela 3. Descrição estatística referente ao metabolismo tecidual, infiltração inflamatória, marcadores pró-oxidativos e defesas antioxidantes no músculo gastrocnêmio dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC, avaliados nos DPN 60 e 90. Os valores correspondem à estatística de teste (F ou Wald χ^2) e ao respectivo valor de p, obtidos pela análise two-way ANOVA, considerando os fatores: condição nutricional neonatal (SL ou NL) e tratamento (vitC ou veículo), bem como a interação. Para as variáveis cujos resíduos não atenderam aos pressupostos de normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e/ou de homogeneidade de variâncias (teste de Levene), foi utilizado modelo linear generalizado, sendo a estatística de teste expressa como Wald χ^2 . $p<0,05$.

Variável	DPN 60 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação	DPN 90 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação
Gastrocnêmio						
<i>Metabolismo tecidual</i>						
Massa relativa muscular	$F_{1,42}=8.99$ $p=0.005$	$F_{1,42}=0.44$ $p=0.511$	$F_{1,42}=2.18$ $p=0.147$	$F_{1,49}=1.03$ $p=0.314$	$F_{1,49}=0.29$ $p=0.596$	$F_{1,49}=0.016$ $p=0.901$
Triacilglicerol	$F_{1,36}=1.33$ $p=0.256$	$F_{1,36}=3.54$ $p=0.068$	$F_{1,36}=6.72$ $p=0.014$	Wald $\chi^2_1=0.04$ $p=0.841$	Wald $\chi^2_1=4.07$ $p=0.044$	Wald $\chi^2_1=0.17$ $p=0.681$
Colesterol	Wald $\chi^2_1=8.32$ $p=0.004$	Wald $\chi^2_1=6.5$ $p=0.011$	Wald $\chi^2_1=7.36$ $p=0.007$	Wald $\chi^2_1=9.94$ $p=0.002$	Wald $\chi^2_1=0.11$ $p=0.741$	Wald $\chi^2_1=9.01$ $p=0.003$
Glicogênio	$F_{1,42}=9.98$ $p=0.003$	$F_{1,42}=11.43$ $p=0.002$	$F_{1,42}=16.28$ $p<0.0001$	$F_{1,31}=1.95$ $p=0.172$	$F_{1,31}=0.16$ $p=0.692$	$F_{1,31}=0.08$ $p=0.777$
Glicose	$F_{1,36}=2.58$ $p=0.117$	$F_{1,36}=65.39$ $p<0.001$	$F_{1,36}=2.74$ $p=0.107$	$F_{1,33}=0.81$ $p=0.375$	$F_{1,33}=0.17$ $p=0.680$	$F_{1,33}=0.23$ $p=0.631$
<i>Infiltração inflamatória</i>						
Atividade MPO	$F_{1,33}=0.62$ $p=0.437$	$F_{1,33}=3.60$ $p=0.066$	$F_{1,33}=1.16$ $p=0.151$	Wald $\chi^2_1=23.0$ $p<0.0001$	Wald $\chi^2_1=23.62$ $p<0.0001$	Wald $\chi^2_1=10.02$ $p=0.002$
Atividade NAG	$F_{1,32}=4.82$ $p=0.035$	$F_{1,32}=0.71$ $p=0.406$	$F_{1,32}=0.5$ $p=0.486$	$F_{1,33}=4.04$ $p=0.053$	$F_{1,33}=38.95$ $p<0.0001$	$F_{1,33}=35.48$ $p<0.0001$
<i>Marcadores pró-oxidativos</i>						
Malondialdeído (MDA)	$F_{1,30}=0.34$ $p=0.562$	$F_{1,30}=0.04$ $p=0.849$	$F_{1,30}=0.98$ $p=0.331$	$F_{1,34}=1.02$ $p=0.32$	$F_{1,34}=0.07$ $p=0.799$	$F_{1,34}=0.007$ $p=0.933$
Carbonilação proteica (PCO)	Wald $\chi^2_1=0.091$ $p=0.763$	Wald $\chi^2_1=0.903$ $p=0.342$	Wald $\chi^2_1=0.91$ $p=0.763$	Wald $\chi^2_1=4.69$ $p=0.03$	Wald $\chi^2_1=0.45$ $p=0.502$	Wald $\chi^2_1=0.22$ $p=0.638$
Redução de NBT	$F_{1,29}=6.67$ $p=0.015$	$F_{1,29}=8.17$ $p=0.008$	$F_{1,29}=0.124$ $p=0.728$	$F_{1,35}=7.92$ $p=0.008$	$F_{1,35}=1.70$ $p=0.201$	$F_{1,35}=0.24$ $p=0.630$
<i>Defesa antioxidante</i>						
Glutathiona reduzida (GSH)	$F_{1,30}=27.16$ $p<0.0001$	$F_{1,30}=1.26$ $p=0.271$	$F_{1,30}=3.76$ $p=0.062$	$F_{1,35}=0.71$ $p=0.406$	$F_{1,35}=0.92$ $p=0.344$	$F_{1,35}=9.41$ $p=0.004$
Superóxido dismutase (SOD)	Wald $\chi^2_1=0.36$ $p=0.549$	Wald $\chi^2_1=0.017$ $p=0.895$	Wald $\chi^2_1=0.085$ $p=0.771$	$F_{1,34}=0.13$ $p=0.72$	$F_{1,34}=0.02$ $p=0.898$	$F_{1,34}=0.08$ $p=0.783$
Catalase (CAT)	Wald $\chi^2_1=0.177$ $p=0.674$	Wald $\chi^2_1=0.177$ $p=0.674$	Wald $\chi^2_1=13.89$ $p<0.0001$	$F_{1,27}=1.731$ $p=0.199$	$F_{1,27}=2.516$ $p=0.124$	$F_{1,27}=8.076$ $p=0.008$
Poder redutor férrico (FRAP)	$F_{1,29}=1.76$ $p=0.196$	$F_{1,29}=9.28$ $p=0.005$	$F_{1,29}=0.39$ $p=0.535$	$F_{1,34}=2.33$ $p=0.136$	$F_{1,34}=1.40$ $p=0.244$	$F_{1,34}=1.27$ $p=0.268$
Capacidade antioxidante (ABTS)	$F_{1,29}=7.55$ $p=0.010$	$F_{1,29}=0.06$ $p=0.809$	$F_{1,29}=0.21$ $p=0.65$	$F_{1,30}=6.12$ $p=0.019$	$F_{1,30}=19.46$ $p<0.0001$	$F_{1,30}=2.99$ $p=0.094$

5.4 Avaliação do metabolismo tecidual, homeostase redox e infiltração inflamatória:

Músculo Sóleo

No DPN 60, foi observada interação entre os fatores para a massa relativa do músculo sóleo (Figura 20A; Tabela 4). Entretanto, o pós-teste não identificou diferenças entre os grupos experimentais. No DPN 90, também foi observada interação entre os fatores para a massa relativa do músculo sóleo, em que os animais SL veículo apresentaram maior massa relativa desse músculo em comparação aos animais NL veículo. Adicionalmente, houve aumento da massa relativa apenas nos animais NL suplementados com vitC em relação aos NL veículo (Figura 20B; Tabela 4).

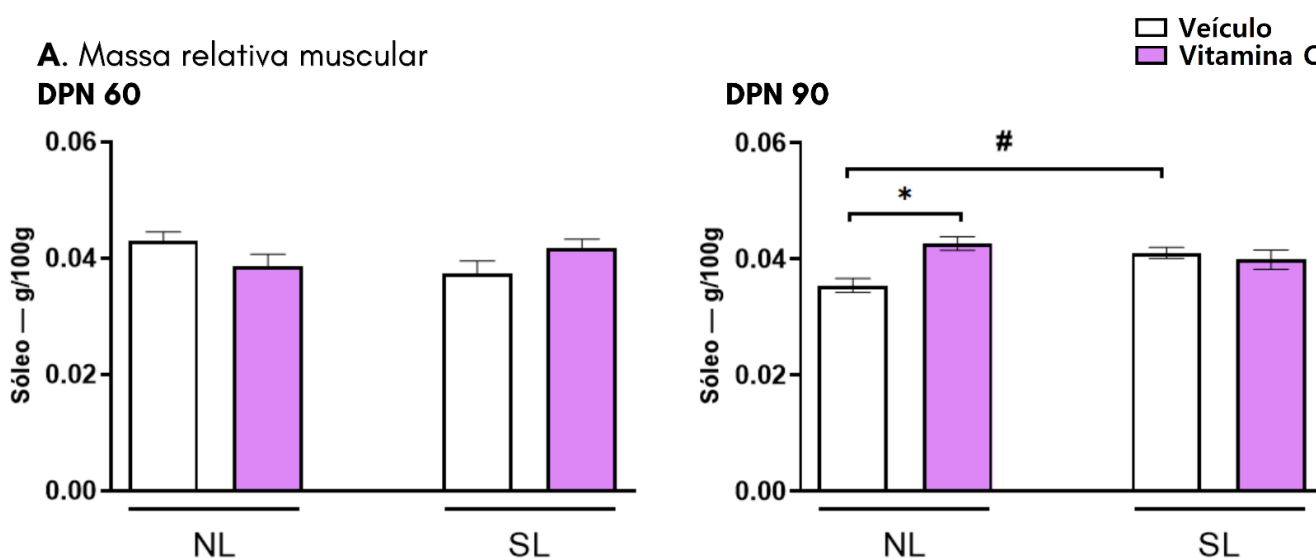


Figura 20. Massa relativa do músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Massa relativa do músculo sóleo (g/100 g de peso corporal) (A). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=13-15$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

5.4.1 Metabolismo tecidual

Em relação ao metabolismo lipídico avaliado no músculo sóleo, no DPN 60, não foram observadas interações entre os fatores para as concentrações de triacilgliceróis e colesterol. Da mesma forma, não houve efeito da condição nutricional neonatal nem da suplementação sobre esses parâmetros (Figura 21A, B; Tabela 4).

No DPN 90, foi observada interação entre os fatores para a concentração de triacilgliceróis. Entretanto, o pós-teste não identificou diferenças entre os grupos experimentais (Figura 21A; Tabela 4). Em relação ao colesterol, não houve interação nem efeito da suplementação com vitC; contudo, os animais SL apresentaram uma maior concentração em comparação aos animais NL, sem efeitos da vitC (Figura 21B; Tabela 4).

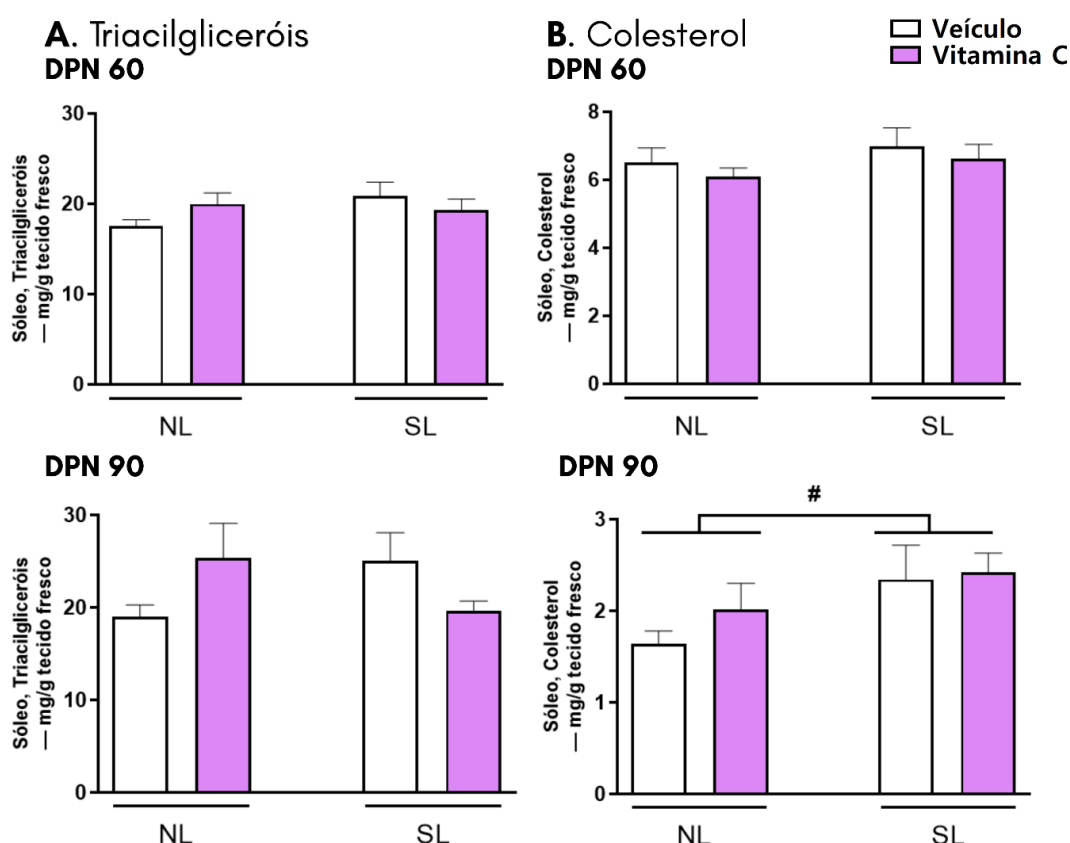


Figura 21. Metabolismo lipídico do músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração de triacilgliceróis (mg/g de tecido fresco) (A) e colesterol (mg/g de tecido fresco) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=8–12/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

Em relação ao metabolismo glicídico no músculo sóleo, no DPN 60, não foi observada interação para a concentração de glicogênio. Foram observados efeitos da condição nutricional neonatal e da suplementação, sendo as concentrações de glicogênio menores nos animais SL em comparação aos animais NL, além serem de reduzidas pela suplementação com vitC, tanto nos NL quanto

nos SL tratados (Figura 22A; Tabela 4). Em relação à glicose, foi observada interação, caracterizada pela sua redução nos animais NL-vitC e SL-veículo em comparação aos NL-veículo (Figura 22B; Tabela 4). No DPN 90, não foram observadas interações, nem efeitos da condição nutricional neonatal ou da suplementação com vitC sobre as concentrações de glicogênio e glicose no músculo sóleo (Figura 22; Tabela 4).

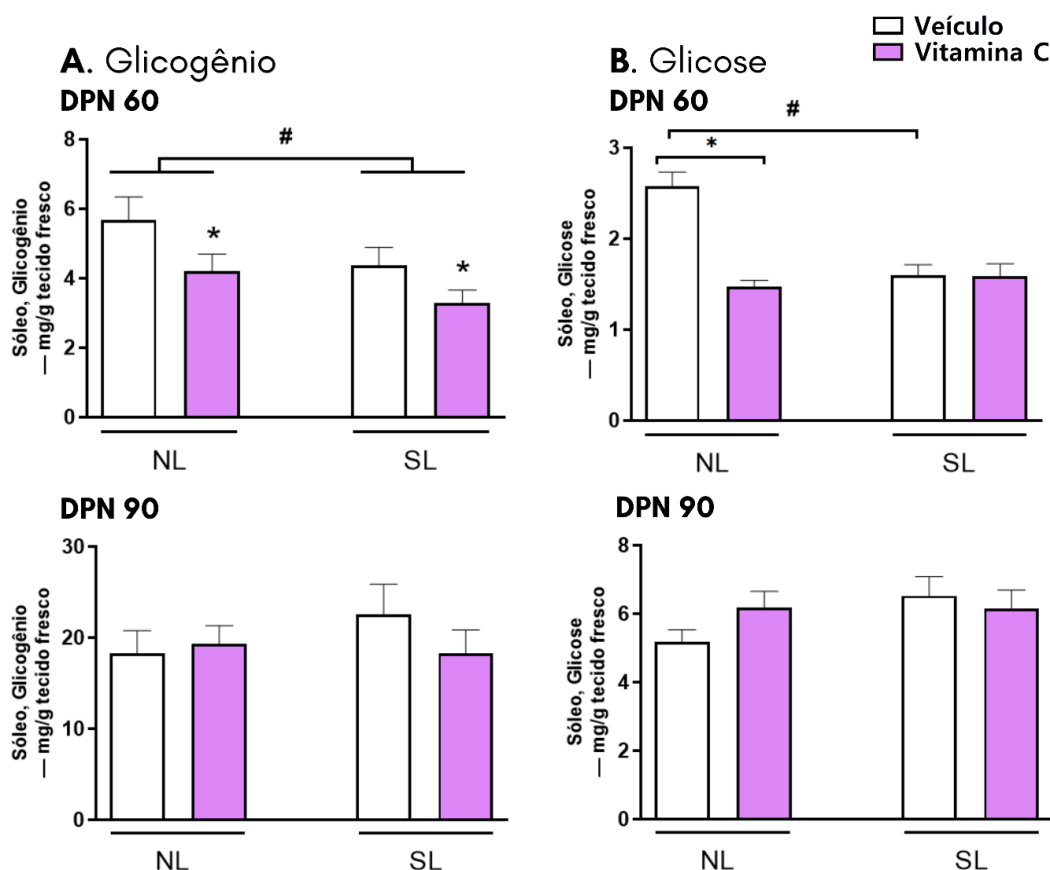


Figura 22. Metabolismo glicídico do músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração de glicogênio (mg/g de tecido fresco) (A) e glicose (mg/g de tecido fresco) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM (n=8–12/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.4.2 Infiltração inflamatória

No DPN 60, não foi observada interação para as atividades de MPO e NAG. Para a atividade de MPO, os animais SL apresentaram menor atividade em comparação aos animais NL, enquanto a suplementação com vitC promoveu seu aumento (Figura 23; Tabela 4). Em relação à atividade de NAG, não foram

observadas diferenças entre os grupos experimentais (Figura 23B; Tabela 4). No DPN 90, foi observada interação para a atividade de MPO. Entre os animais veículo, a atividade de MPO foi maior nos animais SL em comparação aos NL, ao passo que, entre os vitC, os animais NL apresentaram maior atividade enzimática que os animais SL. Nos animais NL, a vitC promoveu seu aumento, enquanto, nos animais SL, promoveu sua redução (Figura 23A; Tabela 4). Em relação à atividade de NAG, não foram observadas diferenças entre os grupos (Figura 23B; Tabela 4).

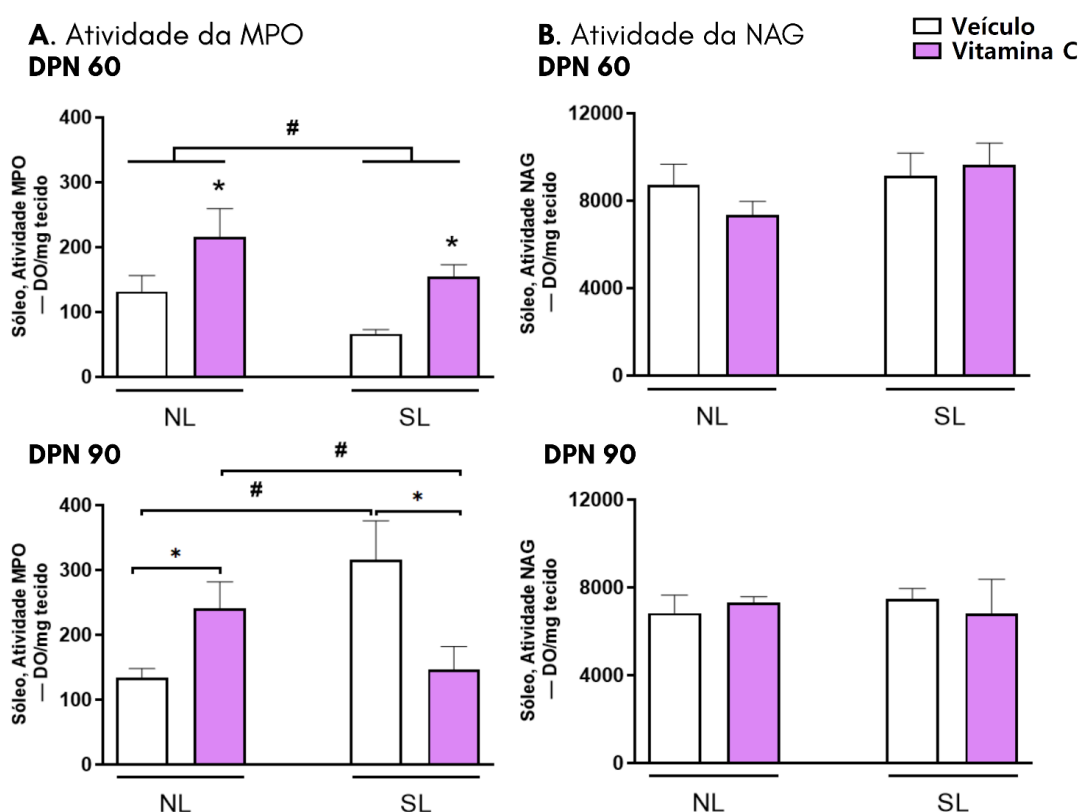


Figura 23. Infiltração inflamatória do músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Atividade da mieloperoxidase (MPO) (U/mg de tecido) (A) e da N-acetil-β-D-glicosaminidase (NAG) (U/mg de tecido) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=9–10/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.4.3 Marcadores pró-oxidativos

No DPN 60, não foi observada interação para a concentração de MDA, carbonilação proteica e redução de NBT no músculo sóleo. As concentrações de MDA e a redução de NBT não diferiram entre os grupos experimentais (Figura 24A, C; Tabela 4). Em relação à carbonilação proteica, a suplementação com vitC

promoveu seu aumento, no grupo NL e SL tratados (Figura 24; Tabela 4). No DPN 90, também não foi observada interação para as concentrações de MDA e de carbonilação proteica. A concentração de MDA não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 24A; Tabela 4). Para a carbonilação proteica, os animais SL apresentaram maiores concentrações em comparação aos animais NL, e a suplementação com vitC promoveu aumento desse parâmetro (Figura 24B; Tabela 4). Em relação à redução de NBT, foi observada interação, a vitC promoveu seu aumento nos animais SL, em comparação aos seus controles (Figura 24C; Tabela 4).

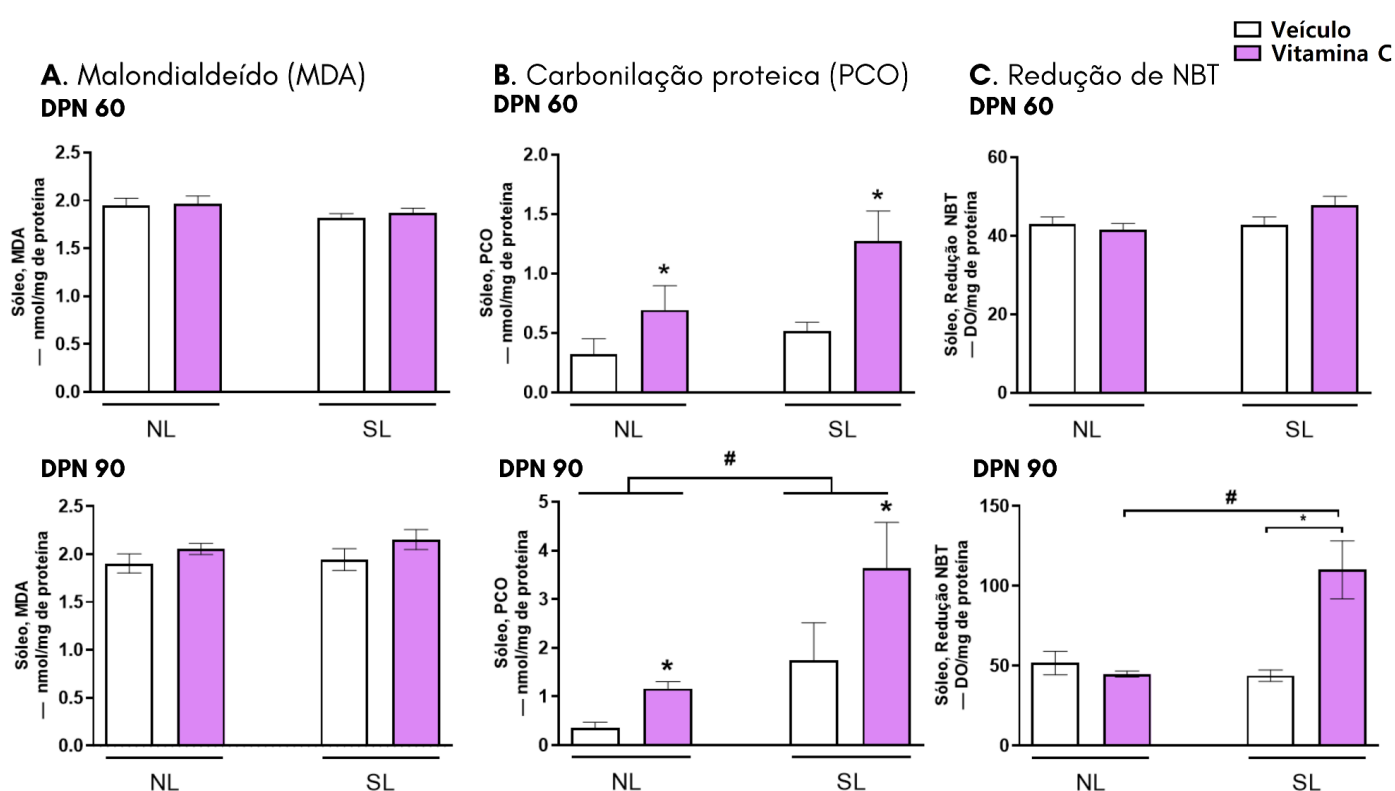


Figura 24. Marcadores pró-oxidantes do músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Concentração de malondialdeído (MDA) (nmol/mg de proteína) (A), carbonilação proteica (PCO) (nmol/mg de proteína) (B) e redução do nitroblue tetrazolium (NBT) (DO/mg de tecido) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=8-12/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

5.4.4 Avaliação das defesas antioxidantes

Em relação ao sistema de defesas antioxidantes, no DPN 60, foi observada interação apenas para a atividade da SOD. Essa interação foi

caracterizada pelo aumento de sua atividade nos animais NL-vitC, em comparação ao seu respectivo veículo (Figura 25A; Tabela 4). A atividade da catalase não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 25B; Tabela 4). Em relação à GSH, não houve interação; entretanto, os animais SL apresentaram menores concentrações desse antioxidante em comparação aos animais NL, e a vitC reduziu suas concentrações (Figura 25C; Tabela 4). No DPN 90, não foram observadas interações entre os fatores, ou efeitos dos fatores para as concentrações de GSH, nem para as atividades da SOD e da CAT (Figura 25; Tabela 4).

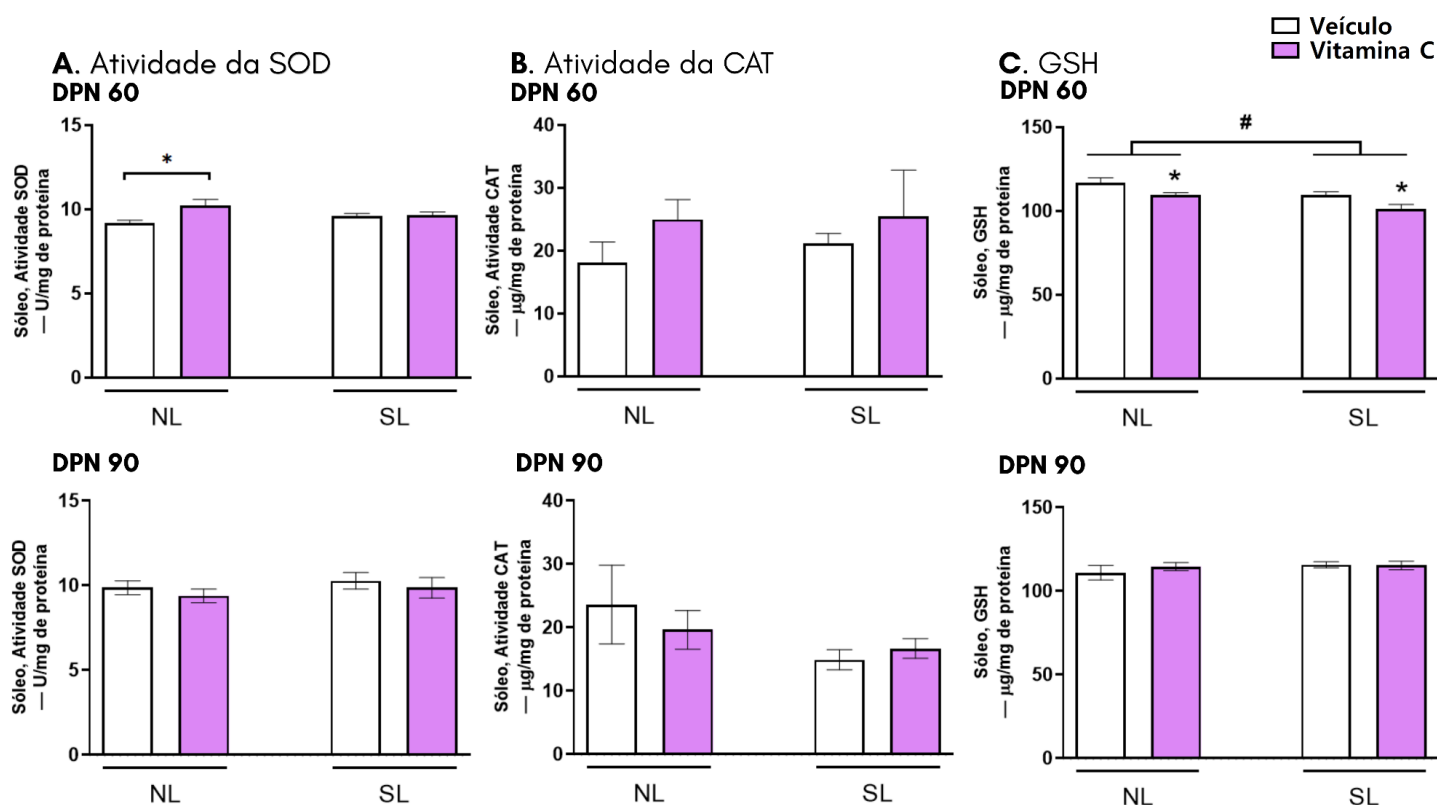


Figura 25. Defesas antioxidantes do músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Atividade da superóxido dismutase (SOD) (U/mg de proteína) (A), atividade da catalase (CAT) (µg/mg de proteína) (B) e concentração de glutathione reduzida (GSH) (nmol/mg de proteína) (C). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média ± EPM (n=10/grupo). * p<0,05 para comparação entre tratamentos; # p<0,05 para comparação entre ninhadas.

Já em relação às análises da capacidade antioxidante, no DPN 60, não foi observada interação entre os fatores para o FRAP e ABTS no músculo sóleo. Em relação ao FRAP, a suplementação com vitC promoveu sua redução, independentemente da condição nutricional neonatal (Figura 26A; Tabela 4). Para a

capacidade antioxidante total, avaliada pelo ensaio de ABTS, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais (Figura 26B; Tabela 4). No DPN 90, não foi observada interação para o FRAP, e esse parâmetro não diferiu entre os grupos experimentais (Figura 26A; Tabela 4). Em relação ao ABTS, foi observada interação, caracterizada pelo seu aumento nos animais SL-vitC, que passaram a apresentar valores superiores aos observados nos animais SL-veículo e NL-vitC (Figura 26B; Tabela 4).

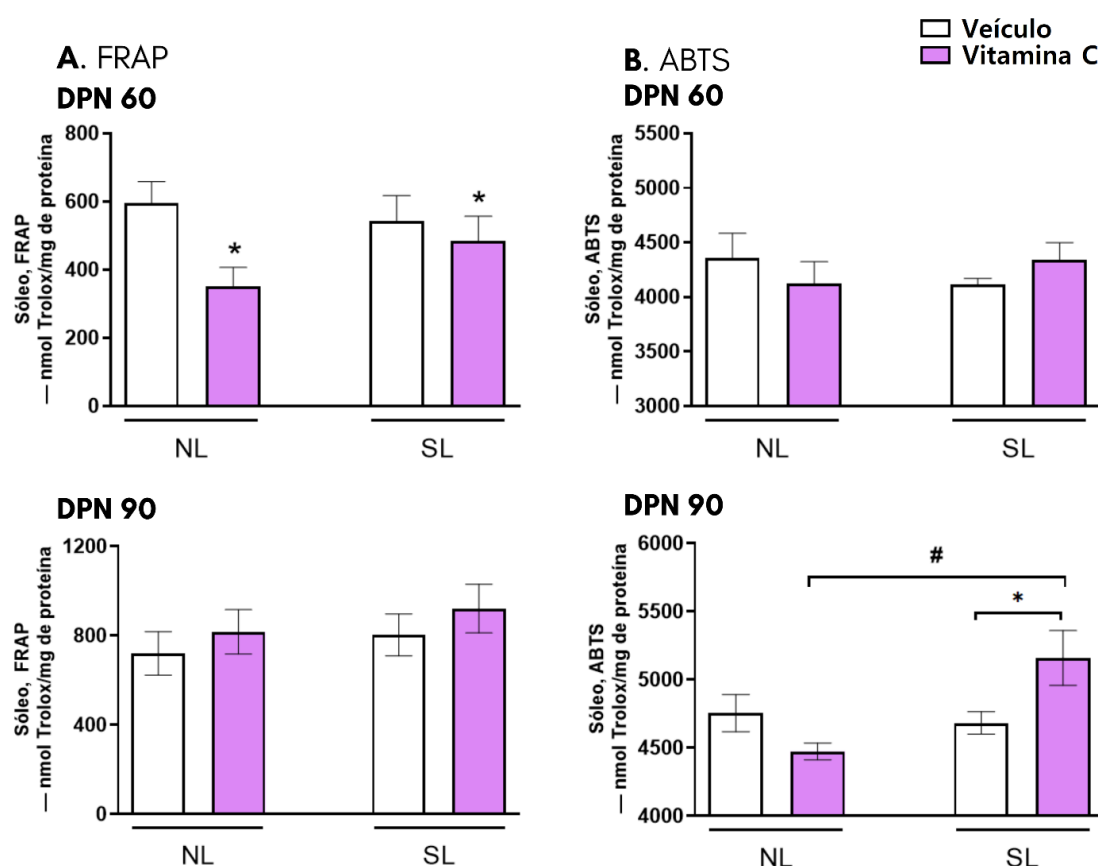


Figura 26. Capacidade antioxidante do músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC nos DPN 60 e 90. Poder antioxidante redutor férrico (FRAP) (nmol Trolox/mg de proteína) (A) e capacidade antioxidante total determinada pelo método ABTS (nmol Trolox/mg de proteína) (B). Os dados estão apresentados para as avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). Os resultados são expressos como média $\pm$ EPM ($n=10-12$ /grupo). * $p<0,05$ para comparação entre tratamentos; # $p<0,05$ para comparação entre ninhadas.

Tabela 4. Descrição estatística referente ao metabolismo tecidual, à infiltração inflamatória, aos marcadores pró-oxidativos e às defesas antioxidantes no músculo sóleo dos grupos NL-Veículo, NL-vitC, SL-Veículo e SL-vitC, avaliados nos DPN 60 e 90. Os valores correspondem à estatística de teste (F ou Wald χ^2) e ao respectivo valor de p, obtidos pela análise two-way ANOVA, considerando os fatores: condição nutricional neonatal (SL ou NL) e tratamento (vitC ou veículo), bem como a interação. Para as variáveis cujos resíduos não atenderam aos pressupostos de normalidade (teste

de Shapiro-Wilk) e/ou de homogeneidade de variâncias (teste de Levene), foi utilizado modelo linear generalizado, sendo a estatística de teste expressa como Wald χ^2 . $p < 0,05$.

Variável	DPN 60 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação	DPN 90 Ninhada SL/NL	Tratamento VitC/Veículo	Interação
Músculo Sóleo						
<i>Metabolismo tecidual</i>						
Massa relativa muscular	Wald $\chi^2_1=0.37$ $p=0.546$	Wald $\chi^2_1=0.001$ $p=0.969$	Wald $\chi^2_1=4.72$ $p=0.03$	F _{1,48} =1.23 $p=0.273$	F_{1,48}=5.75 $p=0.02$	F_{1,48}=11.05 $p=0.002$
Triacilglicerol	F _{1,29} =1.2 $p=0.283$	F _{1,29} =0.21 $p=0.648$	F _{1,29} =2.88 $p=0.100$	F _{1,33} =0.154 $p=0.697$	F _{1,33} =0.001 $p=0.978$	F_{1,33}=4.302 $p=0.046$
Colesterol	F _{1,27} =1.33 $p=0.259$	F _{1,27} =0.84 $p=0.367$	F _{1,27} =0.004 $p=0.95$	F_{1,33}=5.87 $p=0.021$	F _{1,33} =1.05 $p=0.312$	F _{1,33} =.174 $p=0.679$
Glicogênio	F_{1,37}=4.53 $p=0.040$	F_{1,37}=5.83 $p=0.021$	F _{1,37} =0.15 $p=0.705$	F _{1,34} =0.4 $p=0.536$	F _{1,34} =0.41 $p=0.527$	F _{1,34} =1.08 $p=0.307$
Glicose	F_{1,37}=15.54 $p<0.0001$	F_{1,37}=22.33 $p<0.0001$	F_{1,37}=9.12 $p=0.005$	F _{1,29} =1.74 $p=0.197$	F _{1,29} =0.41 $p=0.527$	F _{1,29} =1.86 $p=0.183$
<i>Infiltração inflamatória</i>						
Atividade MPO	F_{1,27}=5.04 $p=0.033$	F_{1,27}=13.36 $p=0.001$	F _{1,27} =0.97 $p=0.333$	F _{1,33} =0.15 $p=0.7$	F _{1,33} =0.57 $p=0.457$	F_{1,33}=14.03 $p=0.001$
Atividade NAG	F _{1,28} =2.16 $p=0.152$	F _{1,28} =0.25 $p=0.622$	F _{1,28} =1.02 $p=0.321$	Wald $\chi^2_1=0.008$ $p=0.93$	Wald $\chi^2_1=0.01$ $p=0.92$	Wald $\chi^2_1=0.45$ $p=0.503$
<i>Marcadores pró-oxidativos</i>						
Malondialdeído (MDA)	F _{1,28} =2.77 $p=0.107$	F _{1,28} =0.31 $p=0.584$	F _{1,28} =0.07 $p=0.800$	F _{1,32} =0.51 $p=0.480$	F _{1,32} =3.48 $p=0.071$	F _{1,32} =0.09 $p=0.765$
Carbonilação proteica (PCO)	Wald $\chi^2_1=3.09$ $p=0.079$	Wald $\chi^2_1=7.36$ $p=0.007$	Wald $\chi^2_1=0.05$ $p=0.825$	Wald $\chi^2_1=12.39$ $p<0.0001$	Wald $\chi^2_1=6.11$ $p=0.013$	Wald $\chi^2_1=0.32$ $p=0.575$
Redução de NBT	F _{1,30} =2.42 $p=0.131$	F _{1,30} =0.75 $p=0.393$	F _{1,30} =2.49 $p=0.125$	Wald $\chi^2_1=9.61$ $p=0.002$	Wald $\chi^2_1=10.83$ $p=0.001$	Wald $\chi^2_1=20.3$ $p<0.0001$
<i>Defesa antioxidante</i>						
Glutathiona reduzida (GSH)	F _{1,27} =9.23 $p=0.005$	F _{1,27} =9.12 $p=0.005$	F _{1,27} =0.04 $p=0.842$	F _{1,32} =0.89 $p=0.351$	F _{1,32} =0.33 $p=0.572$	F _{1,32} =0.49 $p=0.488$
Superóxido dismutase (SOD)	F _{1,30} =0.08 $p=0.774$	F_{1,30}=5.99 $p=0.02$	F_{1,30}=4.49 $p=0.043$	F _{1,31} =0.77 $p=0.387$	F _{1,31} =1.1 $p=0.302$	F _{1,31} =0.0001 $p=0.983$
Catalase (CAT)	F _{1,28} =0.17 $p=0.682$	F _{1,28} =1.44 $p=0.241$	F _{1,28} =1.52 $p=0.229$	F _{1,32} =0.98 $p=0.33$	F _{1,32} =0.06 $p=0.81$	F _{1,32} =0.23 $p=0.634$
Poder redutor férrico (FRAP)	F _{1,30} =0.36 $p=0.551$	F_{1,30}=5.14 $p=0.031$	F _{1,30} =1.952 $p=0.173$	F _{1,32} =0.83 $p=0.369$	F _{1,32} =1.09 $p=0.305$	F _{1,32} =0.01 $p=0.915$
Capacidade antioxidante (ABTS)	Wald $\chi^2_1=0.005$ $p=0.945$	Wald $\chi^2_1=0.0001$ $p=0.995$	Wald $\chi^2_1=2.01$ $p=0.156$	F_{1,28}=4.28 $p=0.048$	F _{1,28} =0.31 $p=0.548$	F_{1,28}=6.33 $p=0.018$

6. DISCUSSÃO

Os principais achados deste estudo revelam que a supernutrição neonatal induzida pela redução do tamanho da ninhada estabeleceu um fenótipo persistente de obesidade e disfunção metabólica, já evidente no DPN 60 e mantido ou agravado no DPN 90, caracterizado por maior adiposidade visceral e comprometimento progressivo da homeostase glicêmica. No fígado, esse quadro foi acompanhado por alterações duradouras no metabolismo glicídico e lipídico e por diferentes configurações redox e inflamatórias ao longo do tempo. No músculo esquelético, as repercussões da programação neonatal também evoluíram de maneira tecido-específica: o MG apresentou comprometimento metabólico-redox mais pronunciado já no primeiro momento avaliado, enquanto o MS exibiu maior preservação inicial, embora já apresentasse alterações metabólicas e antioxidantes, evoluindo posteriormente para manifestações de dano oxidativo e infiltração inflamatória.

Os efeitos da suplementação com vitC durante a puberdade também foram dependentes do momento e da condição nutricional neonatal, manifestando-se imediatamente após a intervenção e, de forma particularmente relevante, 30 dias após seu término, quando foram observadas atenuações de componentes importantes do fenótipo programado pela obesidade lactacional. A persistência destes impactos reforça a puberdade como uma relevante janela de plasticidade metabólica, na qual intervenções podem modificar o curso estabelecido por exposições nutricionais ocorridas no início da vida (Hanson & Gluckman, 2014; Burton & Alonso, 2024; Skowronski et al., 2024). A discussão a seguir integra os achados dos dois momentos avaliados, considerando suas repercussões sistêmicas e por tecido sobre o metabolismo, a homeostase redox e a infiltração inflamatória.

PERFIL METABÓLICO SISTÊMICO

Avaliação imediata

Avaliação tardia

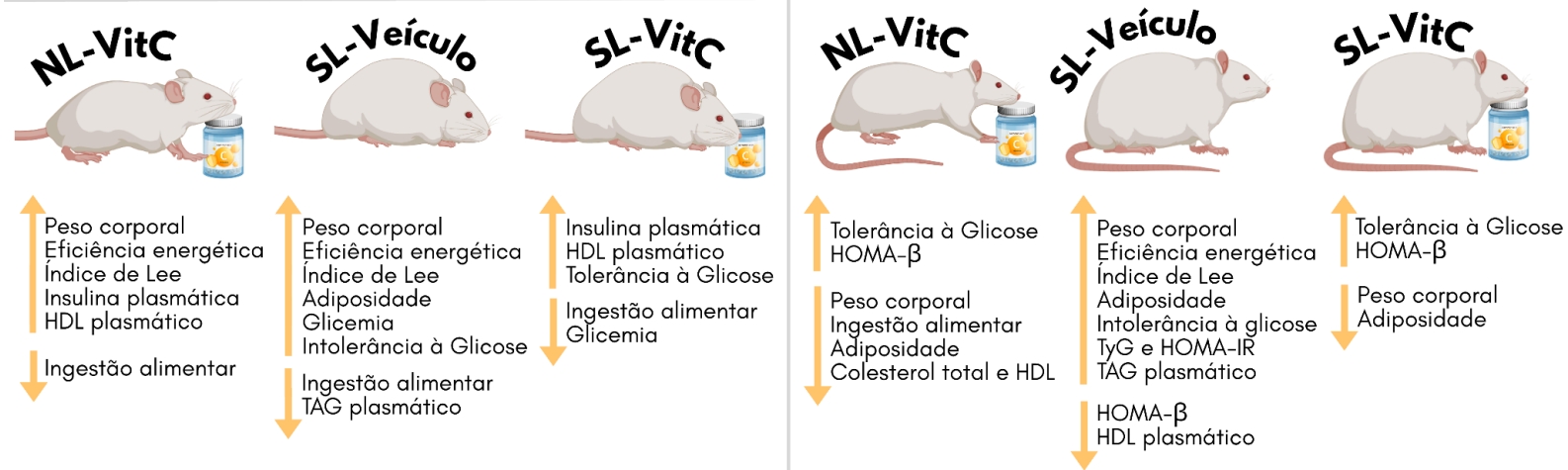


Figura 27. Síntese esquemática das alterações no perfil metabólico sistêmico induzidas pela supernutrição neonatal e pela suplementação com vitC, nas avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). As setas indicam aumento (↑) ou redução (↓) dos parâmetros em relação ao respectivo grupo controle. DPN, dia pós-natal; NL, ninhada normal; SL, ninhada reduzida; VitC, vitamina C; TAG, triacilgliceróis.

Nos dois momentos avaliados, os animais SL apresentaram maior ganho de peso corporal, eficiência energética, adiposidade visceral (TAE e TAR) e índice de Lee em relação aos NL, confirmando a reprodutibilidade do modelo como indutor de obesidade e a persistência ao longo do desenvolvimento (Plagemann, 2005; Souza et al., 2022; De Souza et al., 2023; Fischer et al., 2024). Esse padrão é compatível com uma programação duradoura de mecanismos centrais e periféricos envolvidos no controle do balanço energético, incluindo modificações na responsividade hipotalâmica aos sinais de leptina e insulina, no gasto energético e na termogênese, além do direcionamento de processos relacionados ao armazenamento energético (Patel & Srinivasan, 2011; Habbout et al., 2013; Marangon et al., 2020; Fischer et al., 2024).

Os dados de ingestão alimentar reforçam tal interpretação: o maior ganho ponderal e a elevada eficiência energética dos animais SL ocorreram, no DPN 60, apesar da hipofagia; e permaneceram no DPN 90, quando o consumo alimentar já não diferia entre os grupos, evidenciando que o maior ganho de peso não foi dependente de hiperfagia, e sim resultado de uma ampla mudança no balanço entre a oferta, utilização e retenção energética dos nutrientes (Stefanidis &

Spencer, 2012; Habbout et al., 2013; Marangon et al., 2020). Tais alterações no gasto energético e na termogênese, associadas ao aumento do armazenamento de substratos, podem explicar a alta eficiência energética observada e a manutenção da adiposidade visceral nos animais SL. Estes dados confirmam que os impactos da supernutrição lactacional sobre o balanço energético se perpetuam até a vida adulta.

Considerando os achados discutidos previamente, a avaliação do perfil lipídico plasmático identificou modificações qualitativas adicionais nos animais SL ao longo do desenvolvimento. No DPN 60, apresentaram menor concentração plasmática de triacilgliceróis, juntamente à maior adiposidade e à intolerância à glicose, caracterizada pelo aumento da AUC no GTT e pela hiperglicemia basal. A menor triacilglicerolemia e maior adiposidade indica que a alteração do metabolismo lipídico não se manifesta primariamente pelo aumento da disponibilidade circulante de triacilgliceróis, mas por mudanças em seu particionamento entre circulação, utilização e armazenamento (Frayn, 2002; Virtue & Vidal-Puig, 2010; Beals et al., 2021). Em condições de expansão do tecido adiposo, como observado no presente estudo, a captação e esterificação de ácidos graxos constituem mecanismos de tamponamento do fluxo lipídico circulante, favorecendo seu armazenamento na forma de triacilgliceróis; variações na capacidade de estocagem e na supressão da lipólise, por outro lado, estão associadas à maior disponibilização de ácidos graxos e à resistência à insulina (Virtue & Vidal-Puig, 2010; Beals et al., 2021).

Já a intolerância à glicose, estabelecida mesmo sem alterar os índices HOMA-IR e TyG, aponta que o comprometimento da homeostase glicêmica precedeu mudanças detectáveis por estes índices basais. Tal achado é fisiologicamente plausível, considerando que o GTT avalia dinamicamente a capacidade de controle do organismo frente à sobrecarga glicêmica, envolvendo secreção de insulina, supressão da produção endógena de glicose e captação periférica, enquanto HOMA-IR e TyG constituem estimativas indiretas obtidas em condição basal e podem não evidenciar, primariamente, disfunções precoces ou tecido-específicas da ação insulínica (Sánchez-García et al., 2020; Varghese et al., 2020; Reckziegel et al., 2023). No DPN 90, entretanto, a persistência da intolerância à glicose nos animais SL passou a coexistir com o aumento dos índices HOMA-IR e TyG e com a redução de HOMA- β , além da redução do colesterol-HDL. Essa

progressão ocorreu sincronicamente a uma inversão do perfil lipídico sistêmico: a triacilglicerolemia, reduzida no DPN 60, tornou-se elevada na avaliação tardia. Tal convergência é mecanisticamente relevante, uma vez que a homeostase lipídica e a ação da insulina são processos metabolicamente interdependentes (Perry et al., 2015; Petersen & Shulman, 2018; Sakamoto et al., 2025).

Em condições fisiológicas, a insulina tem importante ação antilipolítica no tecido adiposo, restringindo a mobilização dos triacilgliceróis armazenados e a liberação de ácidos graxos circulantes; com a redução da sensibilidade à insulina, essa supressão torna-se menos eficiente, alterando o fluxo de lipídios entre armazenamento e utilização (Perry et al., 2015; Xia et al., 2018; Petersen & Shulman, 2018; Sakamoto et al., 2025; Kotikalapudi et al., 2025). Quando, adicionalmente, a capacidade de armazenamento do tecido adiposo torna-se insuficiente frente à oferta energética, o excedente de ácidos graxos passa a ser captado e depositado em outros tecidos periféricos (Virtue & Vidal-Puig, 2010; Asterholm et al., 2014; Dong et al., 2017; Tol et al., 2025), estabelecendo uma relação potencialmente bidirecional entre desregulação lipídica e resistência à insulina, compatível com a perda progressiva da capacidade de coordenar o armazenamento e a disponibilização dos substratos energéticos de maneira adequada, o que agrava o comprometimento metabólico dos animais SL ao longo do desenvolvimento (Perry et al., 2015; Petersen & Shulman, 2018; Sakamoto et al., 2025; Tol et al., 2025). Diante do perfil metabolicamente comprometido dos animais SL nos dois momentos avaliados, tornou-se relevante compreender em que medida a suplementação com vitC durante a puberdade interferiu nesse percurso e se seus efeitos foram condicionados pelo estado metabólico previamente estabelecido.

No DPN 60, imediatamente após a intervenção, a vitC aumentou o ganho de peso corporal, o índice de Lee e a eficiência energética exclusivamente nos animais NL, apesar da redução da ingestão alimentar; no DPN 90, 30 dias após o término da suplementação, entretanto, diminuiu o ganho de peso e a adiposidade visceral independentemente da condição nutricional neonatal. Tal contraste temporal, particularmente evidenciado pela redução tardia da adiposidade também nos animais SL, cuja ingestão não permaneceu reduzida no período pós-intervenção, indica que os efeitos da vitC não decorreram exclusivamente da

menor oferta energética, modificando o destino metabólico dos substratos. Essa interpretação encontra respaldo em modelos de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, onde a suplementação com vitC reduziu o ganho de peso, a adiposidade visceral e a hipertrofia adipocitária sem modificar o consumo alimentar, juntamente ao aumento da expressão de PPAR α e de genes relacionados à β -oxidação de ácidos graxos no tecido adiposo (Lee et al., 2019). Em outro modelo, estes resultados foram acompanhados por menor expressão de SREBP-1c e SCD1 no tecido adiposo visceral, o que indica um menor direcionamento de substratos para a lipogênese *de novo* (Park et al., 2018), entretanto, não foram diretamente avaliados tais marcadores no presente estudo, sendo uma hipótese mecanística.

A distinção temporal entre as respostas das condições nutricionais à suplementação pode estar relacionada também à janela em que a intervenção foi realizada e ao estado metabólico sobre o qual a vitC atuou. A suplementação entre os DPN 30 e 59 coincidiu com a puberdade, caracterizada por intensa reorganização da composição corporal e de tecidos metabolicamente ativos, incluindo o tecido adiposo. A relevância dessa janela é sustentada experimentalmente: estímulos nutricionais restritos à puberdade foram capazes de alterar de forma persistente o tamanho dos adipócitos e a homeostase metabólica até a vida adulta, mesmo após a retirada do estímulo (Holtrup et al., 2017).

Além de seus efeitos sobre o metabolismo energético, há evidências experimentais de que a vitC participa da função esteroidogênica testicular: em ratos, sua exposição aumentou a atividade de enzimas envolvidas na esteroidogênese e a produção de testosterona (Biswas et al., 1996), enquanto sua administração *in vivo*, em modelos de comprometimento testicular, preservou a produção de testosterona e componentes da maquinaria esteroidogênica das células de Leydig (Murugesan et al., 2007). Essa possível interação é importante pois os andrógenos participam diretamente da maturação e do remodelamento do tecido adiposo: em ratos, testosterona e di-hidrotestosterona exercem efeitos dependentes do depósito adiposo, reduzindo a diferenciação de pré-adipócitos epididimais sem modificar sua proliferação (Dieudonné et al., 2000).

Assim, a administração de vitC durante uma fase de intensa atividade esteroidogênica (como no presente estudo) pode ter interagido com as mudanças

hormonais próprias da puberdade sobre um tecido adiposo ainda em remodelamento, contribuindo para seus efeitos metabólicos imediatos. A expressão morfométrica dessa resposta, como mencionado anteriormente, parece ter dependido do estado metabólico estabelecido durante o período lactacional: enquanto nos animais NL a vitC atuou sobre um organismo sem um desafio nutricional prévio, nos animais SL, a suplementação operou sobre um fenótipo de obesidade persistente (Hou et al., 2011; Fuente-Martín et al., 2012; Habbout et al., 2013). Isto é, nos animais SL, a vitC mitigou componentes da homeostase glicêmica alterados pela programação neonatal: nestes animais, atenuou a hiperglicemia basal e melhorou a tolerância à glicose, embora não tenha restabelecido completamente o controle glicêmico ao nível observado nos animais NL.

A resposta glicêmica observada imediatamente após o término da suplementação foi acompanhada pelo aumento das concentrações plasmáticas de insulina em ambos os grupos suplementados. Nos animais SL, em particular, a maior disponibilidade circulante de insulina pode ter contribuído para a atenuação da hiperglicemia e da intolerância à glicose, ao favorecer a supressão da produção endógena de glicose e a captação periférica desse substrato. Além disso, há evidências experimentais de que a disponibilidade adequada de vitC participa da manutenção da funcionalidade das células β pancreáticas, e da mesma forma, seu déficit compromete a produção de ATP nas ilhotas e a secreção de insulina estimulada pela glicose, efeitos atenuados pela restauração de sua disponibilidade (Wells et al., 1995; Steffner et al., 2004; Senmaru et al., 2012). Embora estes mecanismos não tenham sido diretamente avaliados, a associação entre maior insulinemia e melhora glicêmica observada nos animais SL é compatível com a participação do eixo pancreático na resposta imediata à suplementação.

No DPN 90, entretanto, a melhora da tolerância à glicose passou a ocorrer em ambos os grupos suplementados sem aumento da insulinemia basal, mostrando uma mudança qualitativa na resposta à intervenção. O melhor controle da sobrecarga glicêmica coexistiu com menor ganho de peso corporal e redução da adiposidade visceral, o que configura um contexto metabólico de menor armazenamento energético e melhor controle glicêmico sem necessidade de concentrações plasmáticas elevadas de insulina. Essa associação encontra respaldo

em outros modelos de obesidade, nos quais a vitC reduziu a hipertrofia adipocitária, a hiperglicemia e melhorou a tolerância à glicose (Park et al., 2018), além de atenuar marcadores inflamatórios do tecido adiposo, reduzir a hiperinsulinemia e melhorar a sensibilidade à insulina (Jeon et al., 2023), demonstrando que tais respostas à suplementação não se restringem a um único modelo de obesidade (Abdel-Wahab et al., 2002). Houve, ainda, aumento tardio do índice HOMA- β em todos os animais suplementados, achado consistentemente interpretado como uma relação glicose-insulina basal mais favorável, sendo indicativa de melhor funcionalidade das células β pancreáticas. Nos animais SL, entretanto, apesar da melhora observada nesses parâmetros, a suplementação não reverteu a resistência insulínica previamente evidenciada.

A reorganização da homeostase glicêmica ocorreu juntamente a alterações no perfil lipoproteico, reforçando que os efeitos sistêmicos da vitC envolveram componentes distintos do manejo dos substratos energéticos. No DPN 60, a suplementação aumentou o colesterol-HDL independentemente da condição nutricional neonatal, simultaneamente ao aumento da insulinemia e, nos animais SL, à melhora do controle glicêmico. Experimentalmente, a vitC pode interferir no metabolismo das lipoproteínas por mecanismos hepáticos (posteriormente melhor discutidos), incluindo a supressão da expressão de PCSK9, com aumento da disponibilidade de LDLR e da captação de LDL (Wang et al., 2020). Além disso, a maior disponibilidade de vitC foi associada a modificações favoráveis na distribuição do colesterol entre as frações lipoproteicas, incluindo maiores concentrações de HDL (Shi et al., 2021). Esses achados indicam que a resposta plasmática imediata à vitC foi além do metabolismo glicídico, alcançando também o transporte sistêmico de lipídios.

Na avaliação tardia, contudo, a resposta lipídica revelou que as repercussões metabólicas da vitC não dependeram da normalização uniforme das diferentes frações circulantes. Nos animais NL, a suplementação reduziu simultaneamente o colesterol total e o HDL plasmáticos; associada à manutenção da menor ingestão alimentar, essa resposta coincidiu com redução do ganho de peso e da adiposidade visceral, apontando para uma ampla reorganização do balanço energético e do metabolismo do colesterol (Wang et al., 2020; Zeng et al., 2020).

Nos animais SL, por outro lado, a vitC também reduziu o ganho de peso e a adiposidade e melhorou a tolerância à glicose, enquanto o aumento da concentração plasmática de triacilgliceróis e a redução do HDL associados à condição SL permaneceram independentes da suplementação.

Embora a vitC não tenha modificado essa alteração plasmática de forma direta, sua coexistência com a redução da adiposidade, melhora da tolerância à glicose e atenuação do acúmulo lipídico intra-hepático nos animais SL (melhor abordado futuramente) revela que os impactos da suplementação sobre o manejo dos substratos apresentaram diferenças entre os compartimentos metabólicos. Tal dissociação é fisiologicamente plausível, uma vez que a concentração plasmática de triacilgliceróis resulta do equilíbrio entre a produção e secreção de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis e sua remoção pelos tecidos periféricos (Minehira et al., 2008), enquanto o conteúdo lipídico tecidual depende adicionalmente de processos de captação, síntese, oxidação e exportação (Minehira et al., 2008; Ha et al., 2012), aspecto explorado posteriormente.

Em síntese, os achados sistêmicos evidenciam que a supernutrição neonatal resultou em um perfil de obesidade persistente, que compromete progressivamente a coordenação entre o balanço energético e as homeostases glicêmica e lipídica ao longo do desenvolvimento. A suplementação com vitC durante a puberdade interferiu nessa trajetória de maneira dependente do momento avaliado e do estado metabólico previamente estabelecido, atenuando componentes específicos sem promover normalização homogênea entre os compartimentos metabólicos. Considerando a participação fundamental do fígado na integração desses fluxos e na regulação da disponibilidade sistêmica de glicose e lipídios (Petersen et al., 2017), tornou-se relevante investigar como a programação neonatal e a suplementação com vitC repercutiram sobre a homeostase hepática.

FÍGADO

Avaliação imediata

Avaliação tardia

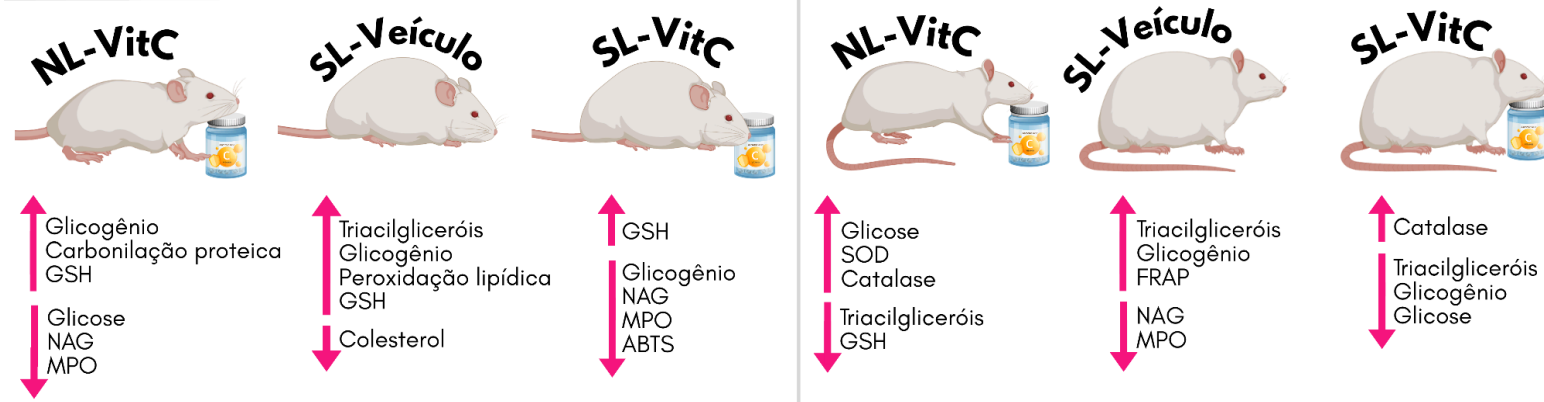


Figura 28. Síntese esquemática das alterações hepáticas induzidas pela supernutrição neonatal e pela suplementação com vitamina C durante a puberdade, nas avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). As setas indicam aumento (↑) ou redução (↓) dos parâmetros em relação ao respectivo grupo controle. DPN, dia pós-natal; GSH, glutathiona reduzida; SOD, superóxido dismutase; FRAP, poder antioxidante redutor férrico; ABTS, capacidade antioxidante total; MPO, mieloperoxidase; NAG, N-acetil-β-D-glicosaminidase; NL, ninhada normal; SL, ninhada reduzida; VitC, vitamina C.

As disfunções hepáticas observadas no presente estudo revelaram que a progressão da obesidade ocasionada pela supernutrição neonatal envolveu mudanças persistentes na condução intra-hepática dos substratos energéticos. Em ambas as idades avaliadas, os animais SL apresentaram simultaneamente maiores concentrações hepáticas de triacilgliceróis e glicogênio, sinalizando maior retenção de reservas energéticas de natureza lipídica e glicídica no fígado. No DPN 60, esse padrão coexistiu com as alterações sistêmicas descritas anteriormente, evidenciando que o comprometimento metabólico precoce dos animais SL ocorreu em um contexto de maior direcionamento dos substratos energéticos para armazenamento tecidual: a menor triacilglicerolemia plasmática indica que, neste momento, o excedente lipídico estava preferencialmente associado ao armazenamento hepático, em detrimento de sua permanência circulante.

Essa relação entre os compartimentos é fisiologicamente consistente, considerando a relevante participação do fígado na distribuição dos lipídios entre armazenamento, oxidação e exportação, uma vez que os ácidos graxos captados ou sintetizados nos hepatócitos podem ser esterificados e armazenados como triacilgliceróis ou incorporados às VLDL e secretados para a circulação;

consequentemente, desbalanços neste equilíbrio modificam a distribuição dos triacilgliceróis entre fígado e plasma (Minehira et al., 2008; Petersen et al., 2017). Experimentalmente, isso é evidenciado pela redução da exportação hepática de VLDL, que diminui a triacilglicerolemia ao mesmo tempo em que aumenta a retenção de triacilgliceróis intra-hepática (Minehira et al., 2008).

O aumento de glicogênio intra-hepático também evidenciado nos animais SL amplia essa interpretação, apontando que o direcionamento de substratos para retenção não esteve restrito ao metabolismo lipídico. O conteúdo de glicogênio tecidual representa o balanço entre sua síntese e mobilização, enquanto a manutenção da glicemia depende da sincronização dinâmica entre captação e utilização da glicose, glicogênese, glicogenólise e gliconeogênese (Petersen et al., 2017; Nozaki et al., 2020). Na obesidade e na resistência à insulina, tais processos não se deterioram de maneira uniforme: as diferentes vias do metabolismo hepático da glicose, como sinalização insulínica, produção hepática de glicose e síntese e armazenamento de glicogênio, podem responder de forma distinta, permitindo que vias de acúmulo permaneçam ativas enquanto o controle da produção e disponibilização hepática de glicose se encontra comprometido, destacando que tais processos são metabolicamente interligados, mas não equivalentes entre si (Kubota et al., 2016; Titchenell et al., 2017; Petersen et al., 2018; Nozaki et al., 2020).

O metabolismo glicogênico, em particular, está estreitamente relacionado ao destino dos demais substratos no hepatócito: a redução da capacidade de armazenar glicose em forma de glicogênio resulta em seu direcionamento para a síntese lipídica, acompanhada por maior acúmulo hepático de triacilgliceróis e na disfuncionalidade da sinalização insulínica (Irimia et al., 2017). Dessa forma, a relação entre armazenamento de glicogênio, produção hepática de glicose e metabolismo lipídico é fundamental para o direcionamento adequado dos substratos energéticos (Kubota et al., 2016; Irimia et al., 2017; Nozaki et al., 2020). Assim, o aumento do glicogênio intra-hepático juntamente à intolerância à glicose observado nos animais SL evidencia que o comprometimento glicêmico ocorreu apesar do maior armazenamento desse substrato, o que reflete a perda de sincronia entre os diferentes fluxos responsáveis pela regulação da glicose hepática,

reforçando que a supernutrição lactacional comprometeu também a condução hepática desse substrato.

Embora o maior armazenamento intra-hepático tenha persistido nos animais SL no DPN 90, a triacilglicerolemia plasmática, anteriormente reduzida, tornou-se elevada, coincidindo com maiores evidências sistêmicas de resistência à insulina, indicando que, com a progressão da obesidade, a capacidade de retenção hepática dos lipídios deixou de ser acompanhada pela menor disponibilidade circulante. Isso é compatível com o mesmo equilíbrio entre armazenamento e exportação hepática de triacilgliceróis discutido anteriormente, agora sob maior pressão: a resistência insulínica no tecido adiposo reduz a ação antilipolítica da insulina, aumentando o fluxo de ácidos graxos para o fígado que, somados àqueles provenientes da lipogênese *de novo*, ampliam a esterificação e formação de triacilgliceróis (Smith et al., 2020; Sakamoto et al., 2025). Tal processo excede, aparentemente, a capacidade de tamponamento hepático que antes mantinha a triacilglicerolemia reduzida. Assim, a programação neonatal deixou de manifestar-se predominantemente como maior retenção tecidual e passou a envolver uma desregulação mais complexa do direcionamento lipídico entre fígado e circulação.

A persistência das alterações hepáticas descritas anteriormente foi acompanhada por modificações também no estado redox, cuja magnitude variou ao longo do desenvolvimento. No DPN 60, os animais SL apresentaram maior peroxidação lipídica hepática, refletindo que o maior acúmulo desse substrato no fígado resultou em dano oxidativo às estruturas lipídicas. Na obesidade, a elevada oferta energética ao hepatócito aumenta o fluxo pelas vias oxidativas e favorece a geração de EROs, particularmente quando a entrada e a síntese de ácidos graxos ultrapassam a capacidade de utilização e exportação. Além disso, intermediários lipídicos e produtos da própria peroxidação comprometem a atividade mitocondrial e outras fontes celulares de ERO, estabelecendo uma relação entre sobrecarga metabólica e propagação do dano oxidativo hepático (Rui, 2014; García-Berumen et al., 2019; Masarone et al., 2018). Entretanto, o aumento da peroxidação lipídica ocorreu juntamente à maior concentração hepática de GSH nos animais SL, um dos principais componentes do sistema antioxidante, que atua diretamente na neutralização de EROs e como substrato para enzimas responsáveis pela redução

de peróxidos, incluindo hidroperóxidos lipídicos (Jones, 2008; Lu, 2013; Sies et al., 2024); indicando uma resposta antioxidante compensatória, que embora ativada, não foi suficiente para impedir o dano lipídico observado.

Na avaliação tardia, o perfil redox hepático apresentou uma configuração distinta daquela observada no DPN 60: apesar da progressão do comprometimento metabólico previamente mencionado, a peroxidação lipídica observada nos animais SL na avaliação imediata não permaneceu na tardia, enquanto houve aumento do poder redutor férrico (evidenciado pelo ensaio de FRAP, que expressa a disponibilidade de compostos capazes de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} na amostra), sem alteração das concentrações de GSH (Benzie & Strain, 1996). Tais achados não indicam resolução do desequilíbrio hepático induzido pela supernutrição neonatal, mas mostram o estabelecimento de mecanismos compensatórios diante do perfil metabólico persistente evidenciado nos animais SL, capazes de ampliar a capacidade redutora do fígado e restringir a propagação da peroxidação lipídica na avaliação tardia; essa resposta celular é compatível com a adaptação dos sistemas antioxidantes diante de pressão oxidativa evidenciada (Sies et al., 2017). Tal interpretação encontra respaldo em estudos experimentais nos quais a capacidade antioxidante avaliada pelo FRAP esteve associada à redução da peroxidação lipídica tecidual, enquanto sua diminuição ocorreu juntamente ao aumento deste dano (Sarkhail et al., 2007; García-Berumen et al., 2023).

A contenção do dano lipídico pode ter repercutido também sobre os marcadores inflamatórios avaliados: as atividades de MPO e NAG, estáveis entre as condições nutricionais no DPN 60 mesmo diante da peroxidação lipídica elevada neste momento, encontraram-se reduzidas nos animais SL no DPN 90, indicando menor infiltração de neutrófilos e macrófagos, participantes ativos da resposta imune e de sua interação com o metabolismo e o estado redox (Rensen et al., 2009; Lefere & Tacke, 2019). A discrepância temporal dessas respostas demonstra que a resposta inflamatória hepática também foi alterada ao longo do desenvolvimento, e não apenas o sistema redox: a redução da atividade de MPO e NAG ocorreu justamente quando deixou de ser observado o dano lipídico e o poder redutor férrico aumentou, sinalizando uma sincronia temporal entre as alterações redox e a hiporresponsividade inflamatória hepática, mecanismo compatível com a estreita

relação entre EROs, produtos da oxidação lipídica e a ativação e o recrutamento dessas células no fígado (Tosello-Tramont et al., 2012; Reid et al., 2016; Daemen et al., 2021). Nesse sentido, a redução simultânea desses marcadores reforça que a progressão do fenótipo SL foi acompanhada por um descompasso entre o comprometimento metabólico e oxidativo ocasionado pela supernutrição lactacional e a capacidade de recrutamento de infiltrado inflamatório hepático. Esse padrão de resposta inflamatória prejudicada em modelos de dano metabólico crônico costuma refletir exaustão ou desregulação da resposta imune inata, e não resolução do processo, corroborando estudos experimentais previamente publicados que a redução da liberação de MPO decorreu de sinalização intracelular comprometida, caracterizando disfunção funcional, e não um estado inflamatório benéfico (Moreau et al, 2019).

As repercussões da suplementação com vitC sobre o fígado também apresentaram importantes distinções temporais. No DPN 60, imediatamente após a intervenção, seus efeitos concentraram-se principalmente sobre os componentes redox e inflamatórios, enquanto, no DPN 90, 30 dias após o término da suplementação antioxidante, tornaram-se mais evidentes sobre o direcionamento dos substratos energéticos. Nos animais SL, particularmente, a redução tardia das concentrações hepáticas de triacilgliceróis e glicogênio mostra que a suplementação atenuou simultaneamente o acúmulo das reservas lipídicas e glicídicas que caracterizava o fenótipo programado pela supernutrição neonatal. Esse efeito ocorreu no mesmo momento em que a vitC reduziu a adiposidade visceral e melhorou a tolerância à glicose, indicando repercussões convergentes da suplementação puberal com vitC sobre diferentes componentes da homeostase energética na vida adulta.

No DPN 60, a vitC aumentou as concentrações hepáticas de GSH independentemente da condição nutricional neonatal. Entretanto, nos animais SL, esse aumento foi observado juntamente à redução da capacidade antioxidante total tecidual avaliada pelo ensaio ABTS. Considerando que estes animais apresentavam maior peroxidação lipídica e um perfil de disfunção metabólica, tais resultados refletem a elevada demanda imposta à rede antioxidante hepática: enquanto a suplementação fortaleceu a disponibilidade de GSH, outros componentes

antioxidantes foram recrutados mais intensamente e consumidos a fim de conter as reações oxidativas, o que resultou na menor capacidade antioxidante total observada (Jones, 2008; Re et al., 1999; Halliwell, 2024). Juntamente a essas respostas, foi evidenciada a redução das atividades de MPO e NAG promovida pela vitC, o que é compatível com ações diretas da vitC sobre essas células, dissociadas da capacidade antioxidante sistêmica: a vitC sustentada pela GSH intra-hepática compete com o cloreto pelo composto I da MPO, redirecionando sua atividade catalítica para longe da formação de HOCl (Peskin et al., 2025), ao mesmo tempo em que reduz a fosforilação de I κ B e a ligação do NF- κ B ao DNA, diminuindo a expressão de genes pró-inflamatórios associados ao recrutamento de macrófagos hepáticos (Gęgotek & Skrzydlewska, 2022). Assim, nos animais SL, a vitC teve ação redox-inflamatória integrada já no DPN 60, na qual o fortalecimento da GSH sustentou tanto a defesa antioxidante quanto a modulação direta dos marcadores inflamatórios, ainda que a capacidade antioxidante total permanecesse condicionada pelo maior desafio oxidativo desse grupo.

Em relação à redução de triacilgliceróis intra-hepáticos, há respaldo em outros modelos de obesidade, nos quais a vitC atenuou marcadores associados à esteatose e o acúmulo lipídico hepático, modificando vias relacionadas à síntese e à utilização de ácidos graxos (Lee et al., 2019; Zeng et al., 2020). Tais efeitos podem envolver seu maior direcionamento à oxidação, uma vez que a vitC participa como cofator da biossíntese de carnitina, molécula indispensável ao transporte desse substrato, em sua forma de cadeia longa, para a matriz mitocondrial e, consequentemente, à sua β -oxidação (Doseděl et al., 2021; Grădinaru & Popa, 2025); estudos experimentais também relacionam sua suplementação ao aumento de PPAR α e de genes envolvidos nessa via, incluindo CPT-1, ACOX e VLCAD (Lee et al., 2019), reforçando a coordenação entre a disponibilidade de carnitina e a ativação transcricional da β -oxidação (Aumailley et al., 2024). No presente estudo, a redução conjunta do glicogênio intra-hepático evidencia que tal repercussão vai para além do metabolismo lipídico: considerando que seu acúmulo persistente no fígado dos animais SL coexistia com intolerância à glicose, a redução dessa reserva juntamente à melhora do GTT é compatível com uma reorganização do destino da glicose hepática, e não somente com uma menor retenção energética (Nozaki et al., 2020).

A melhora sistêmica da tolerância à glicose pode ter participado dessa reorganização hepática, ao mesmo tempo em que as mudanças hepáticas podem ter contribuído para o melhor controle glicêmico, configurando uma resposta metabolicamente integrada: a ação da insulina coordena simultaneamente o metabolismo hepático da glicose e dos lipídios, de modo que a melhora da sua resposta sistêmica modifica o fluxo glicêmico para armazenamento e utilização e reduz estímulos associados à síntese lipídica hepática (Titchenell et al., 2017; Petersen & Shulman, 2018; Smith et al., 2020). Em outros modelos de obesidade, a suplementação com vitC melhorou hiperglicemia, tolerância à glicose e resistência à insulina ao mesmo tempo que reduziu a adiposidade e atenuou alterações hepáticas, reforçando que seus efeitos metabólicos associam a comunicação entre tecido adiposo, controle glicêmico e órgãos responsáveis pelo manejo dos substratos (Lee et al., 2019; Zeng et al., 2020; Jeon et al., 2023).

Essa reorganização hepática, contudo, ocorreu sem normalização da triacilglicerolemia plasmática dos animais SL, que, como discutido anteriormente, permaneceu elevada pela condição neonatal independentemente da suplementação. Como já estabelecido, a concentração plasmática e o conteúdo intra hepático de triacilgliceróis não constituem compartimentos equivalentes, refletindo balanços distintos entre produção/secreção e captação/oxidação (Korenblat et al., 2008; Minehira et al., 2008; Smith et al., 2020). Tais repercussões, portanto, não contradizem o efeito hepático da vitC; evidencia que a suplementação modificou seletivamente a utilização intra-hepática dos lipídios sem normalizar todos os componentes do metabolismo lipídico sistêmico (Minehira et al., 2008; Lee et al., 2019; Zeng et al., 2020).

No DPN 90, além de atenuar efeitos metabólicos ocasionados pela supernutrição lactacional, a suplementação com vitC, mesmo após 30 dias do fim da intervenção, aumentou a atividade da catalase hepática, efeito que ocorreu independentemente da condição nutricional neonatal. Especialmente nos animais SL, considerando o excesso de substratos no hepatócito, sobretudo de ácidos graxos, há aumento em sua utilização pelas vias oxidativas, o que eleva a produção mitocondrial de ERO, incluindo $O_2^{\bullet-}$ e, subsequentemente, H_2O_2 . A catalase atua justamente sobre este último, convertendo-o em água e oxigênio e evitando que seu

acúmulo resulte na presença de metais de transição, na formação de EROs capazes de oxidar lipídios e proteínas (Sies et al., 2017; Masarone et al., 2018; García-Berumen et al., 2019; Halliwell, 2024). Assim, a redução dos substratos intra-hepáticos nos animais SL suplementados, previamente discutida, juntamente ao aumento simultâneo da atividade da catalase, estabelecem uma conexão funcional entre os efeitos tardios da vitC, enquanto a menor retenção de substratos reduz a pressão metabólica no hepatócito (Masarone et al., 2018; García-Berumen et al., 2019), a maior atividade da catalase amplia a capacidade enzimática de decomposição do H_2O_2 , limitando sua disponibilidade para participar de reações oxidativas potencialmente lesivas (Sies et al., 2017; Halliwell, 2024). A ocorrência simultânea desses efeitos evidencia, assim, a atenuação da sobrecarga metabólica associada ao fortalecimento de uma importante via específica de defesa antioxidante no fígado dos animais SL suplementados.

Já nos animais sem desafio nutricional prévio, os NL, os efeitos imediatos da vitC revelaram uma resposta hepática integrada entre o direcionamento da glicose, o estado redox e os marcadores de infiltração inflamatória. A suplementação reduziu a concentração de glicose e aumentou simultaneamente o conteúdo de glicogênio intra-hepático, indicando maior direcionamento da glicose intracelular para retenção no fígado destes animais. Tais efeitos observados refletem um intermediário dinâmico entre captação, fosforilação, utilização e armazenamento, enquanto a formação de glicogênio representa um dos principais destinos da glicose no estado alimentado, fortemente regulada pela disponibilidade do substrato e pela ação da insulina (Petersen et al., 2017; Nozaki et al., 2020). Assim, a coexistência de menor glicose com maior glicogênio intra-hepático nos animais NL-vitC, é compatível com mudanças do particionamento intra-hepático da glicose, deslocando-a para as reservas em detrimento de sua permanência no compartimento. Essa reorganização ocorreu juntamente ao aumento de GSH e à redução das atividades de MPO e NAG hepáticos, o mesmo padrão redox-inflamatório integrado já discutido para os animais SL, aqui reproduzido também nos NL suplementados.

Entretanto, essa resposta não impediu o aumento da carbonilação proteica no fígado dos animais NL-vitC, revelando impactos distintos da vitC sobre

os diferentes alvos moleculares e condições nutricionais neonatais. A carbonilação constitui uma modificação oxidativa relativamente estável das proteínas, resultando tanto da oxidação direta de resíduos de aminoácidos quanto da reação proteica com compostos carbonílicos gerados pela oxidação de carboidratos, lipídios e da própria vitC (Miyata et al., 1998; Dalle-Donne et al., 2003). Experimentalmente, a vitC, embora predominantemente antioxidante em sistemas biológicos, é também um potente agente redutor capaz de propiciar reações pró-oxidantes na presença de metais de transição cataliticamente disponíveis, aos quais regenera a forma reduzida e cataliticamente ativa. Nesse sentido, produtos derivados de sua autooxidação já demonstraram promover a formação de carbonilas proteicas, assim como sistemas contendo vitC e ferro induzem oxidação proteica sob determinadas condições químicas (Palamanda; Kehrer, 1992; Miyata et al., 1998; Kryndushkin et al., 2016). Esse mecanismo oferece uma explicação plausível para o aumento seletivo da carbonilação proteica observada no fígado dos animais NL suplementados na avaliação imediata.

Nos animais que não passaram por nenhum desafio nutricional neonatal, a resposta redox tardia à vitC teve maior abrangência, uma vez que, além do aumento da atividade da catalase mencionado previamente em todos os animais suplementados, a vitC aumentou especificamente a atividade da SOD nos NL-vitC. Essas enzimas atuam de forma sequencial e complementar: a SOD catalisa a dismutação do $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , substrato que a catalase, por sua vez, decompõe, de modo que o aumento simultâneo de ambas evita que a maior remoção do superóxido seja acompanhada pelo acúmulo de seu produto (Sies et al., 2017; Halliwell, 2024). Esse padrão adquire particular relevância diante da resposta observada imediatamente após a intervenção, quando os animais NL-vitC apresentaram aumento de GSH, mas também maior carbonilação proteica. No DPN 90, essa alteração oxidativa proteica não permaneceu, enquanto o aumento conjunto das atividades da SOD e catalase evidencia elevação de duas defesas enzimáticas complementares. Assim, os efeitos redox da exposição peripuberal à vitC nos animais NL também apresentaram evolução temporal, com uma resposta inicialmente heterogênea entre os diferentes componentes avaliados e, posteriormente, maior atividade das defesas antioxidantes enzimáticas, mesmo após 30 dias do fim da intervenção.

Diante deste panorama, os achados do presente estudo discutidos acima mostram que o fígado constitui um tecido fundamental sobre as consequências metabólicas, redox e inflamatórias da supernutrição neonatal, tornando-se progressivamente mais complexo ao longo do desenvolvimento, e que a suplementação com vitC atenuou este perfil de maneira dependente do momento avaliado e da condição nutricional prévia dos animais. Considerando a participação primordial do fígado na integração da homeostase energética com o músculo esquelético (Petersen et al., 2017; Xourafa et al., 2024), foram analisados os principais parâmetros metabólicos, oxidativos e de infiltração inflamatória do MG e MS, dois músculos com características distintas e reconhecidamente diferentes quanto à susceptibilidade às alterações induzidas pela obesidade (Schiaffino & Reggiani, 2011; Smith et al., 2023).

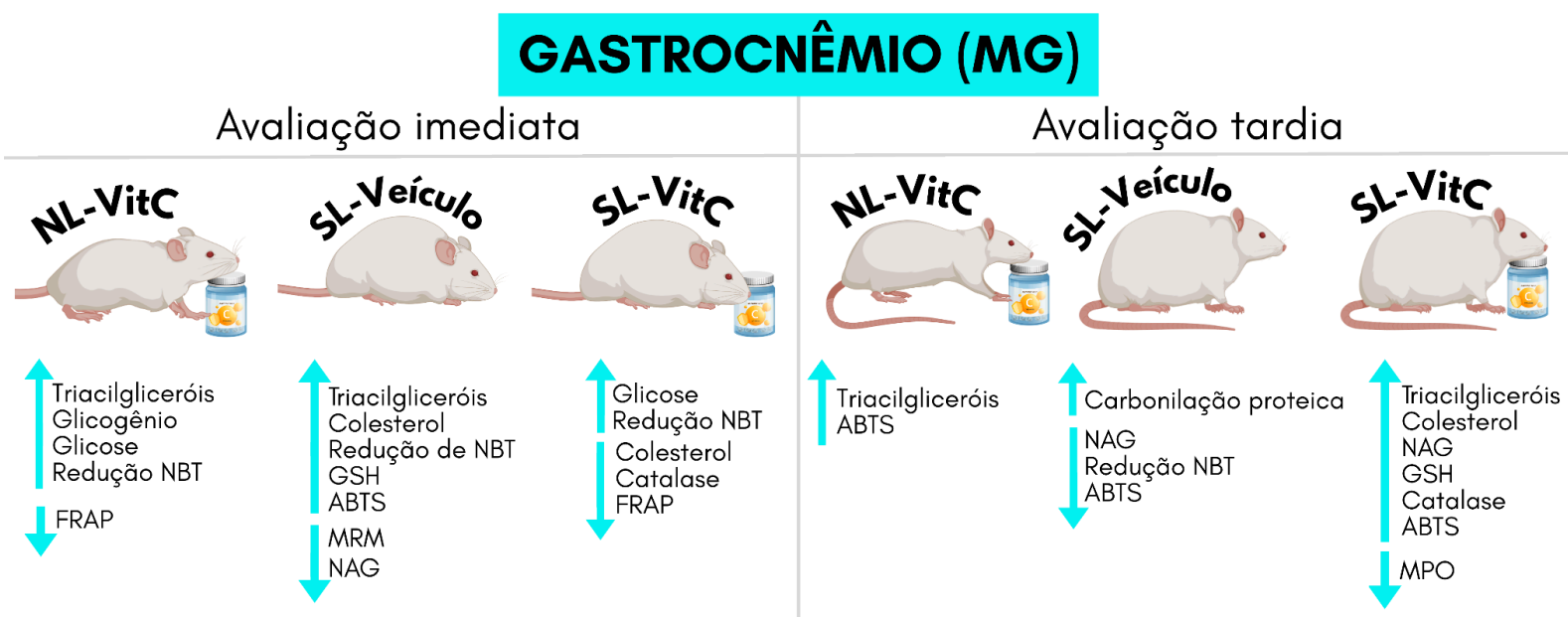


Figura 29. Síntese esquemática das alterações no músculo gastrocnêmio induzidas pela supernutrição neonatal e pela suplementação com vitC, nas avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). As setas indicam aumento (↑) ou redução (↓) dos parâmetros em relação ao respectivo grupo controle. DPN, dia pós-natal; MG, músculo gastrocnêmio; MRM, massa relativa muscular; GSH, glutathiona reduzida; NBT, redução do nitroblue tetrazolium; FRAP, poder antioxidante redutor férrico; ABTS, capacidade antioxidante total; MPO, mieloperoxidase; NAG, N-acetil-β-D-glicosaminidase; NL, ninhada normal; SL, ninhada reduzida; VitC, vitamina C.

Entre os músculos avaliados, o MG apresentou alterações particularmente expressivas em resposta à supernutrição neonatal, envolvendo massa muscular, armazenamento de substratos e homeostase redox, com

manifestações distintas entre os momentos avaliados. No DPN 60, os animais SL apresentaram menor massa relativa do MG acompanhada por maiores concentrações intramusculares de triacilgliceróis e colesterol; considerando que esses animais também apresentavam maior peso corporal e adiposidade, tal achado indica que o crescimento corporal induzido pela supernutrição neonatal não foi acompanhado por expansão proporcional deste músculo.

Em outras palavras, neste primeiro momento avaliado, houve uma redistribuição da massa corporal: a proporção de tecido adiposo aumentou, enquanto a fração de massa muscular, compartimento metabolicamente importante para a utilização de substratos, diminuiu. Essa desproporção adquire relevância metabólica porque o músculo esquelético constitui o principal sítio de captação de glicose estimulada pela insulina e participa fundamentalmente da utilização de ácidos graxos; assim, a redução relativa deste músculo pode limitar sua contribuição no manejo sistêmico dos substratos diante da obesidade (DeFronzo & Tripathy, 2009; Petersen & Shulman, 2018; Gilbert, 2021).

No DPN 90, entretanto, essa configuração muscular foi modificada: a massa relativa alcançou a normalidade e não foi mais observado aumento da retenção de triacilgliceróis e colesterol intramuscular visualizados no MG dos animais SL anteriormente. Porém, tal mudança não acompanhou uma melhora sistêmica; ao contrário, ocorreu justamente quando a intolerância à glicose persistia e passava a coexistir com aumento dos índices HOMA-IR e TyG e redução de HOMA- β (já previamente discutidos), indicando uma evolução da disfunção metabólica mesmo sem a permanência, no MG, das alterações observadas no DPN 60. A comparação com os demais compartimentos ajuda a compreender essa transição. No DPN 60, apesar da parcela proporcionalmente menor de MG, o tecido demonstrava um amplo padrão de retenção, no qual os animais SL apresentavam maior adiposidade, conteúdo hepático e do MG de triacilgliceróis, apesar da menor triacilglicerolemia plasmática.

Dessa forma, a menor concentração de triacilgliceróis circulantes não traduzia redução da carga lipídica corporal, considerando seu maior direcionamento para armazenamento no tecido adiposo, fígado e MG. No DPN 90, isso foi alterado: a triacilglicerolemia plasmática tornou-se elevada e o maior conteúdo hepático de

triacilgliceróis permaneceu, enquanto o MG já não apresentava retenção deste substrato, evidenciando um acúmulo preferencial no fígado, o que reflete uma redistribuição do excesso lipídico entre os compartimentos avaliados ao longo do tempo. Essa mudança é importante, pois o maior conteúdo intramuscular de triacilgliceróis observado no DPN 60 não foi a causa direta do comprometimento metabólico: assim como discutido para o compartimento hepático, essa quantidade armazenada reflete o balanço entre captação, esterificação, mobilização e oxidação dos ácidos graxos (Koves et al., 2008; Petersen & Shulman, 2018; Gilbert, 2021).

Estudos experimentais relatam que a resistência à insulina muscular associada à obesidade pode ocorrer mesmo em contexto de elevada β -oxidação, quando o aumento do fluxo de ácidos graxos não é acompanhado por sua oxidação completa, resultando no acúmulo de metabólitos intermediários e na perda da capacidade de alternância adequada entre lipídios e carboidratos (Koves et al., 2008; Gilbert, 2021; Jani et al., 2023). Por essa razão, a normalização deste parâmetro na avaliação tardia não significa a regularização do fluxo lipídico muscular, sobretudo considerando a maior triacilglicerolemia circulante e resistência à insulina sistêmica (Petersen & Shulman, 2018; Gilbert, 2021; Jani et al., 2023).

A ação metabólica dos lipídios depende não apenas da quantidade total esterificada como triacilgliceróis, mas também do fluxo de ácidos graxos e da formação, localização e composição de intermediários bioativos (Petersen & Shulman, 2018; Jani et al., 2023). Estudos mostram que músculos resistentes à insulina podem apresentar diferentes combinações de triacilgliceróis, DAG, ceramidas e marcadores inflamatórios, apesar de compartilharem comprometimento da sinalização de Akt (Jani et al. 2023). Tal modificação foi similar ao observado na homeostase redox do MG. No DPN 60, a maior retenção energética ocorreu simultaneamente ao aumento da redução de NBT; assim, apesar de sua menor massa relativa, o MG dos animais SL reunia maior carga lipídica e sinal associado à produção de ERO, sinalizando que a modificação do destino dos substratos já repercutia sobre o equilíbrio redox muscular.

A elevada disponibilidade de ácidos graxos pode aumentar o fornecimento de equivalentes redutores à cadeia respiratória e, quando esse fluxo excede a demanda energética, resulta na formação mitocondrial de EROs; estudos

em roedores e em humanos demonstram diretamente que a sobrecarga lipídica aumenta a emissão mitocondrial de H_2O_2 no músculo e altera o estado redox celular, estabelecendo uma conexão mecanística entre sobrecarga lipídica, ERO e resistência à insulina (Koves et al., 2008; Anderson et al., 2009; Gilbert, 2021). A produção aumentada de ERO foi acompanhada por maiores concentrações de GSH e capacidade antioxidante total, o que indica o recrutamento compensatório das defesas antioxidantes frente ao desafio imposto pela sobrecarga metabólica (Jones, 2008; Halliwell, 2024; Sies et al., 2024).

No DPN 90, porém, a redução do NBT tornou-se inferior, acompanhando o desaparecimento da maior retenção intramuscular de triacilgliceróis e colesterol; porém, esse resultado não significou recuperação da homeostase redox, considerando que houve perda da resposta antioxidante compensatória previamente observada, evidenciada pela redução da capacidade antioxidante total e pelo aumento da carbonilação proteica no MG dos animais SL. O estado redox depende do equilíbrio dinâmico entre produção de ERO, sistemas de neutralização e capacidade de remoção ou reparo de biomoléculas modificadas; proteínas carboniladas, inclusive, podem permanecer no tecido mesmo após o fim do estímulo oxidativo que resultou em sua formação (Dalle-Donne et al., 2003; Jones, 2008; Halliwell, 2024; Sies et al., 2024).

A redução da atividade da NAG observada no DPN 60 acrescenta outra dimensão a essa avaliação, mostrando que as disfunções induzidas pela supernutrição neonatal alcançaram também o componente celular associado aos macrófagos na musculatura. Como mencionado previamente na discussão hepática, em condições de excesso de ácidos graxos, sinais derivados do metabolismo lipídico e de ERO podem ativar vias inflamatórias como NF- κ B nos miócitos, estimulando a produção de mediadores como CCL2 e a comunicação com células mieloides, que por sua vez podem modificar a sinalização insulínica e o metabolismo dos miócitos, amplificando a disfunção metabólica muscular (Varma et al., 2009; Fink et al., 2014; Rudrapatna et al., 2019; Hutchinson et al., 2024). Contudo, essa relação não se confirmou de forma linear: justamente no MG com maior retenção lipídica e maior produção de ERO, a atividade de NAG encontrava-se diminuída, padrão que converge com o observado no fígado destes mesmos animais e é compatível com o

acúmulo lipídico comprometendo a função lisossomal dos macrófagos residentes, reduzindo sua capacidade degradativa, em vez de refletir uma atenuação benéfica do processo inflamatório (Wang et al., 2025). Diferentemente dos demais parâmetros musculares avaliados, cuja alteração se restringiu ao DPN 60 ou se inverteu no DPN 90, a menor atividade de NAG nos animais SL persistiu também na avaliação tardia, evidenciando uma trajetória temporal distinta da observada nos demais parâmetros e sugerindo um efeito duradouro sobre este componente no MG (Rudrapatna et al., 2019).

No DPN 60, a menor massa relativa, a maior retenção lipídica e as alterações redox existiam juntamente à intolerância à glicose, apesar de HOMA-IR e TyG ainda permanecerem inalterados. Como o músculo esquelético responde por grande parte da captação de glicose estimulada pela insulina, essas disfunções podem ter reduzido a eficiência do direcionamento da sobrecarga glicêmica (DeFronzo & Tripathy, 2009; Petersen & Shulman, 2018; Gilbert, 2021). Cabe ressaltar que a entrada de glicose no músculo não depende exclusivamente da ação insulínica, podendo também ser estimulada pela contração muscular por vias parcialmente distintas, envolvendo AMPK, Ca^{2+} e Rac1, que convergem para a translocação de GLUT4 (Richter & Hargreaves, 2013; Sylow et al., 2013; 2016; 2017).

Portanto, a interpretação aqui proposta refere-se especificamente ao componente insulino-dependente dessa via. Quando o fluxo intracelular de ácidos graxos excede sua utilização ou esterificação segura, intermediários como diacilgliceróis e ceramidas podem interferir na sinalização IRS-PI3K-Akt e na translocação de GLUT4 (Petersen & Shulman, 2018; Gilbert, 2021; Jani et al., 2023). Em humanos, o aumento de DAG muscular foi associado à ativação de PKC θ (Szendroedi et al., 2014), maior fosforilação inibitória de IRS-1 e redução da ativação de IRS-1 e AKT2 estimulada pela insulina (Szendroedi et al., 2014), enquanto ceramidas têm sido relacionadas ao comprometimento da ativação de Akt e da captação muscular de glicose (Adams et al., 2004; Boon et al., 2013; Gilbert, 2021).

Na avaliação tardia, esse comprometimento sistêmico, já discutido, seguiu progredindo mesmo sem a elevada retenção de triacilgliceróis e colesterol intramuscular. Estes achados reforçam que a progressão da resistência à insulina

não exige a manutenção de maior conteúdo total de lipídios teciduais de forma homogênea, envolvendo mudanças duradouras no fluxo e na sinalização intracelular (Petersen & Shulman, 2018; Gilbert, 2021; Jani et al., 2023), o que corrobora estudos experimentais que relatam que, na vida adulta, houve redução da expressão de IRS-1 e GLUT4, aumento da fosforilação inibitória de IRS-1 e modificações em genes relacionados à ação insulínica muscular, mostrando que a exposição nutricional neonatal pode programar de maneira prolongada a capacidade de resposta desse tecido à insulina (Liu et al., 2013; Jani et al., 2023). Assim, essa passagem entre os dois momentos avaliados revela que o MG passou de um fenótipo precoce marcado por menor representação relativa, maior retenção de substratos e desafio oxidativo compensado pelo recrutamento de defesas antioxidantes, para uma condição tardia em que o maior armazenamento lipídico tecidual já não era evidente, porém houve perda da capacidade antioxidante total tecidual, além de dano proteico e agravamento sistêmico da resistência à insulina.

Diante desse quadro de comprometimento metabólico-redox progressivo, torna-se relevante compreender em que medida a suplementação com vitC na puberdade modificou esse cenário. Os impactos da vitC sobre o MG revelaram uma resposta que se reorganizou entre a avaliação imediatamente posterior à intervenção e aquela realizada 30 dias após seu término, principalmente nos animais submetidos à supernutrição neonatal. No DPN 60, a vitC aumentou a concentração intramuscular de glicose e reduziu o colesterol, sem promover aumento de glicogênio ou intensificar o conteúdo de triacilgliceróis, ao mesmo tempo em que reduziu a glicemia plasmática, indicando que sua ação imediata favoreceu a disponibilidade e o direcionamento da glicose pelo MG sem simplesmente direcioná-la para retenção energético. Uma possível ligação molecular entre esses efeitos reside na própria redução do colesterol muscular: em condições de resistência à insulina, o excesso de colesterol nas membranas desorganiza a F-actina cortical necessária ao tráfego de GLUT4, enquanto sua redução restaura a organização do citoesqueleto, o recrutamento do transportador e a captação de glicose (Habegger et al., 2012; Llanos et al., 2015; Fazakerley et al., 2019).

Embora o colesterol tecidual não tenha sido determinado especificamente na membrana, sua redução no MG dos animais SL, associada à

maior concentração de glicose intramuscular, à redução da glicemia circulante e à menor concentração de glicogênio hepático nos mesmos animais, demonstra que a repercussão imediata da suplementação com vitC alcançou de forma convergente o controle glicêmico sistêmico, o fígado e um dos principais tecidos responsáveis pela utilização da glicose. Tal resultado encontra respaldo experimental: a suplementação com vitC aumentou sua concentração no músculo esquelético e melhorou a sensibilidade periférica à insulina e o descarte de glicose, juntamente à melhora da condição redox muscular, além de melhorar a tolerância à glicose e a sensibilidade à insulina em diferentes condições de disfunção metabólica (Mason et al., 2016; Franke et al., 2018; Jeon et al., 2023). A ausência de mudança sobre o glicogênio no MG dos animais SL corrobora esse efeito, pois indica que a maior disponibilidade muscular de glicose não se restringiu à sua conversão em reserva, e evidências experimentais relatam que a vitC pode alterar de maneira integrada o metabolismo glicídico e a condição oxidativa muscular (Bulduk et al., 2006; Park et al., 2018).

A resposta redox observada neste primeiro momento integra a reorganização metabólica promovida pela vitC no MG. O aumento glicêmico muscular ocorreu juntamente ao aumento da produção de ERO e à redução do FRAP e, especificamente no músculo dos animais SL, da atividade da catalase. Ao neutralizar espécies oxidantes, a vitC doa elétrons e é oxidada, necessitando posteriormente ser regenerada por sistemas celulares dependentes de equivalentes redutores, incluindo GSH (Meister, 1994; Linster & Van Schaftingen, 2007; Halliwell, 2024). Assim, embora a própria vitC possua capacidade de reduzir Fe^{3+} e contribua diretamente para o FRAP, sua menor capacidade redutora após a suplementação sugere que o conjunto de agentes redutores do MG encontrava-se menos disponível na forma reduzida, indicando a maior mobilização para sustentar a demanda redox evidenciada pelo aumento da produção de ERO intramuscular (Silvestrini et al., 2023; Silvestrini & Mancini, 2024).

Nos animais com supernutrição lactacional, essa reorganização envolveu a atividade da catalase, cuja redução pode indicar modificação na contribuição relativa dessa via para a remoção de H_2O_2 , uma vez que as diferentes defesas antioxidantes musculares respondem de maneira específica às alterações da demanda metabólica e redox (Powers et al., 1994; Pinho et al., 2017). Esse efeito

ter ocorrido exclusivamente nos SL evidencia que, diante do comprometimento previamente evidenciado no MG desses animais, o efeito principal da suplementação com vitC sobre este músculo dos animais com supernutrição neonatal, na avaliação imediata, foi metabólico-glicêmico associado a tentativa de reorganização redox tecidual.

No DPN 90, a repercussão da vitC sobre o MG dos animais SL evoluiu para uma reestruturação integrada do direcionamento lipídico e da capacidade antioxidante, acompanhando a melhora metabólica sistêmica promovida pela suplementação. Nesse momento, a vitC reduziu adiposidade e os conteúdos hepáticos de triacilgliceróis e glicogênio, enquanto aumentou triacilgliceróis no MG, juntamente à melhora da tolerância à glicose e da funcionalidade das células β pancreáticas.

Tais achados evidenciam uma mudança na participação relativa dos tecidos no manejo dos substratos (já mencionada anteriormente), diminuindo sua retenção hepática e favorecendo maior participação muscular no metabolismo lipídico. Como previamente discutido, a vitC atua como cofator da biossíntese de carnitina, auxiliando no transporte mitocondrial e na utilização dos ácidos graxos; no MG, especificamente, essa participação ganha relevância adicional porque o próprio músculo constitui um importante compartimento de acúmulo de vitC, cuja disponibilidade se relaciona experimentalmente à capacidade de oxidação lipídica tecidual (Johnston et al., 2006; Carr et al., 2013). Se essa maior capacidade oxidativa se traduziu em maior fluxo de ácidos graxos pelo músculo, seria esperado que parte desse substrato fosse temporariamente esterificada em triacilgliceróis antes de sua mobilização para oxidação, um destino que, ao limitar a permanência dos ácidos graxos como intermediários bioativos, capazes de comprometer a sinalização insulínica, tornaria o próprio aumento do triacilglicerol parte de um processamento lipídico mais dinâmico, e não simples indicador de sobrecarga (Listenberger et al., 2003; Liu et al., 2007; Petersen & Shulman, 2018).

O aumento conjunto de GSH e da atividade da catalase especificamente nos SL-vitC, juntamente à maior capacidade antioxidante total observada no MG, fortalece tal interpretação, mostrando que a maior presença de triacilgliceróis ocorreu acompanhada pelo aumento do fortalecimento antioxidante, e não por

deterioração redox. Como já discutido para o DPN 60, a vitC pode participar simultaneamente do metabolismo energético e da manutenção das defesas necessárias para conter a demanda oxidativa associada ao processamento de substratos. Neste segundo momento avaliado, 30 dias após o fim da suplementação com vitC, os dados do MG dos animais SL suplementados, juntamente às repercussões sistêmicas e hepáticas discutidas, sustentam a hipótese de maior participação muscular no direcionamento lipídico, amparada por um ambiente redox fortalecido.

A evidenciada reorganização discutida anteriormente alcançou também os marcadores de infiltração inflamatória no MG, uma vez que, nos mesmos animais SL, a vitC reduziu a atividade de MPO e aumentou a de NAG. A menor atividade de MPO, como mencionada anteriormente, indica redução da atividade associada ao componente neutrofílico e, conseqüentemente, da geração de oxidantes no tecido (Peskin et al., 2025), o que evidencia um efeito particularmente relevante por ocorrer simultaneamente ao aumento de três defesas antioxidantes avaliadas. Já o aumento da atividade de NAG promovido pela vitC é compatível com uma recuperação funcional dos macrófagos residentes no MG, cuja capacidade degradativa lisossomal encontrava-se comprometida pelo acúmulo lipídico nos animais SL não suplementados (Wang et al., 2025), reforçando que a intervenção não apenas reduziu o componente neutrofílico, mas também restaurou parte da função macrofágica local.

Experimentalmente, a vitC reduz atividade de MPO e infiltração neutrofílica no músculo esquelético submetido a lesão oxidativa, mostrando que a vitC pode limitar diretamente esse componente da resposta mieloide (Kearns et al., 2004). Por outro lado, o aumento de NAG, que demonstra maior atividade associada aos macrófagos (Bourbouze et al., 1991), sugere que a vitC não suprimiu globalmente a resposta celular, mas modificou sua organização: a menor participação neutrofílica potencialmente pró-oxidante coexistiu com maior atividade macrofágica. Como a vitC participa da manutenção da capacidade redox e fagocítica das células mieloides (Carr & Maggini, 2017) e favorece a remoção de neutrófilos apoptóticos por macrófagos (Vissers & Wilkie, 2007; Carr & Maggini, 2017), estes achados podem auxiliar na manutenção e resolução da resposta tecidual. Assim,

estes achados, juntamente ao fortalecimento das defesas antioxidantes já discutidas neste músculo, apontam para uma ação coordenada da vitC sobre o microambiente do MG, principalmente naqueles com maior comprometimento metabólico-redox.

Nos animais NL, os efeitos da suplementação antioxidante sobre o MG também apresentaram evolução temporal, porém sobre um tecido metabolicamente preservado. No DPN 60, a vitC aumentou conjuntamente glicose, glicogênio e triacilgliceróis musculares, o que é coerente com um maior direcionamento dos substratos ao armazenamento energético e que ocorreu juntamente ao aumento do ganho de peso, da eficiência energética e do índice de Lee nestes mesmos animais, mesmo com a redução da ingestão alimentar. Assim, a repercussão muscular integrou uma resposta sistêmica de extensa complexidade à suplementação, na qual a elevada disponibilidade de substratos foi acompanhada por maior eficiência em sua conversão em massa corporal. Essa reorganização metabólica coexistiu com aumento da redução de NBT e redução do FRAP, mostrando que a retenção muscular também modificou a demanda redox tecidual. A alta capacidade muscular de captação de vitC via SVCT2, cuja expressão aumenta após a suplementação mesmo em tecido metabolicamente preservado, fornece plausibilidade para uma ação direta da intervenção sobre o MG. Tal mecanismo encontra respaldo na literatura, sendo evidenciado que, em indivíduos saudáveis, a maior disponibilidade muscular de vitC não necessariamente promove alterações proporcionais das defesas antioxidantes, reforçando a variação da resposta considerando o contexto metabólico (Mason et al., 2014).

No DPN 90, após 30 dias do fim da intervenção, essa configuração predominantemente anabólica não persistiu: os efeitos sobre glicose e glicogênio musculares desapareceram e o aumento de triacilgliceróis passou a coexistir com maior capacidade antioxidante total, enquanto sistemicamente a vitC melhorou a tolerância à glicose, a funcionalidade das células β pancreáticas e reduziu o colesterol total e o colesterol-HDL plasmático. Dessa forma, a repercussão tardia da intervenção no MG de animais sem desafio nutricional prévio parece ter se deslocado do favorecimento precoce da retenção energética para a reorganização do controle glicêmico e lipídico sistêmico, mantendo no MG maior participação do compartimento lipídico acompanhada por reforço antioxidante.

À luz destes resultados, o MG constituiu um importante alvo da supernutrição neonatal, com repercussões metabólicas, redox e inflamatórias progressivas, enquanto a suplementação peripuberal com vitC modificou essa configuração de maneira dependente da idade e, sobretudo, da condição metabólica prévia. Considerando que a composição de fibras influencia o metabolismo e a susceptibilidade às alterações metabólico-redox, torna-se imprescindível avaliar se esses impactos também ocorreram sobre o MS, músculo de perfil predominantemente oxidativo e funcionalmente distinto do MG (Schiaffino & Reggiani, 2011; Smith et al., 2023).

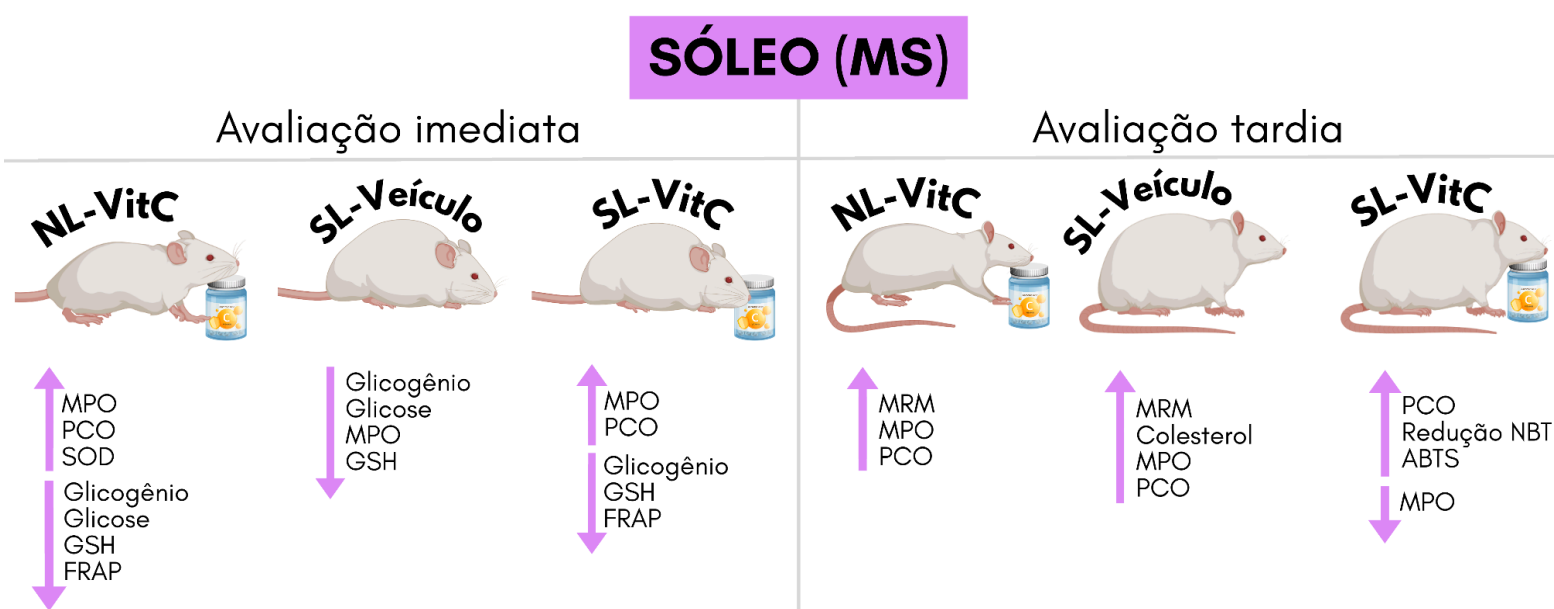


Figura 30. Síntese esquemática das alterações no músculo sóleo induzidas pela supernutrição neonatal e pela suplementação com vitC, nas avaliações imediata (DPN 60) e tardia (DPN 90). As setas indicam aumento (↑) ou redução (↓) dos parâmetros em relação ao respectivo grupo controle. DPN, dia pós-natal; MS, músculo sóleo; MRM, massa relativa muscular; GSH, glutatona reduzida; SOD, superóxido dismutase; FRAP, poder antioxidante redutor férrico; ABTS, capacidade antioxidante total; PCO, carbonilação proteica; NBT, redução do nitroblue tetrazolium; MPO, mieloperoxidase; NL, ninhada normal; SL, ninhada reduzida; VitC, vitamina C.

Diferentemente do MG, o MS apresentou maior preservação inicial frente à supernutrição neonatal, mas a integração dos resultados obtidos nos dois períodos revela que as particulares características do músculo mencionado, parecem ter retardado, porém não impedido, manifestações metabólicas, redox e inflamatórias. No DPN 60, os animais SL apresentaram menores concentrações de glicose, glicogênio, GSH e atividade da MPO no MS, ainda sem aumento de triacilglicerol,

colesterol intramuscular ou de marcadores de dano oxidativo. Estes achados são compatíveis com a elevada capacidade oxidativa e mitocondrial do MS, que lhe confere maior capacidade de utilização de substratos e de adaptação ao excesso energético em comparação a músculos de composição mista, como o MG, podendo retardar a retenção lipídica e suas consequências celulares (Koves et al., 2008; Muoio & Neufer, 2012; Schiaffino & Reggiani, 2011; Petersen & Shulman, 2018). Entretanto, a ausência de acúmulo lipídico ou dano oxidativo neste momento não significa preservação metabólica. A redução simultânea de glicose e glicogênio intramuscular ocorreu justamente quando os animais SL já apresentavam hiperglicemia basal e intolerância à glicose, estabelecendo uma importante relação entre a disponibilidade sistêmica de glicose e sua retenção muscular: enquanto a glicose permanecia inadequadamente elevada na circulação, a concentração de glicogênio, sua principal forma de armazenamento para utilização, estava reduzida no MS.

Como já discutido anteriormente, considerando que o músculo esquelético constitui um dos principais destinos da glicose estimulada pela insulina e que sua incorporação ao glicogênio representa uma parcela importante desse fluxo, esse contraste é compatível com menor direcionamento da glicose circulante para captação e/ou armazenamento no MS, o que contribui para a menor eficiência de depuração glicêmica evidenciada durante o GTT (DeFronzo & Tripathy, 2009; Petersen & Shulman, 2018). Embora os presentes achados não permitam distinguir exatamente as alterações entre captação, oxidação ou síntese de glicogênio, quando os dados aqui obtidos são observados de forma conjunta, mesmo sem o aumento de HOMA-IR e TyG neste primeiro momento, há indícios de uma modificação muscular precoce do destino da glicose, detectável simultaneamente ao comprometimento dinâmico da homeostase glicêmica, mas ainda anterior à resistência insulínica basal mais evidente. Essa interpretação é coerente com estudos experimentais que relatam mudanças precoces da responsividade à insulina, da função mitocondrial e da síntese de glicogênio em músculos oxidativos expostos ao excesso energético (Brunetta et al., 2019; Jani et al., 2021; Morales et al., 2021; Da Eira et al., 2024).

Esse fato observado no MS torna-se ainda mais expressivo quando confrontado com o particionamento dos substratos nos demais tecidos avaliados neste primeiro protocolo. Enquanto glicose e glicogênio estavam reduzidos no MS, os animais SL apresentavam maior conteúdo de glicogênio e triacilglicerol intra hepático e triacilglicerol no MG, apesar da menor triacilglicerolemia plasmática. Portanto, a supernutrição neonatal já havia alterado profundamente o destino dos substratos energéticos, mas de maneira tecido-específica: fígado e MG atuavam como sítios de maior retenção energética, ao passo que o MS ainda restringia o acúmulo lipídico, porém às custas de uma modificação precoce do compartimento glicídico. A redução conjunta de GSH acrescenta uma dimensão redox a essa resposta, considerando que em músculos de elevada atividade oxidativa, como o MS, o aumento do fluxo mitocondrial e da utilização de substratos amplia a demanda sobre sistemas antioxidantes mesmo antes de dano molecular oxidativo detectável (Brunetta et al., 2019).

Corroborando o observado nesta investigação, pesquisas previamente publicadas relataram redução precoce de aproximadamente 25% da GSH no MS de ratos jovens expostos por curto período a dieta hiperlipídica, antes do estabelecimento de EO mensurável (Andrich et al., 2019). Assim, este achado observado no presente estudo, na ausência de dano oxidativo, é compatível com a maior utilização da capacidade redutora durante essa adaptação metabólica inicial à disfunção metabólica ocasionada pela supernutrição neonatal. Nessa fase inicial, a menor atividade da MPO reflete a ausência de estímulo para o recrutamento do componente neutrofílico, e não uma falha de resposta deste, uma vez que a ativação e o recrutamento dessas células dependem da disponibilidade de ERO e produtos da oxidação lipídica como sinais desencadeadores (Tosello-Tramont et al., 2012; Reid et al., 2016; Daemen et al., 2021), ainda ausentes de forma mensurável nesse momento. Esse cenário difere do observado no fígado e no MG, onde a redução desses marcadores coexistiu com dano oxidativo já instalado, sinalizando ali uma resposta mieloide comprometida (Winterbourn et al., 2016).

Entretanto, a configuração do MS analisada na avaliação tardia foi substancialmente diferente daquela observada precocemente. A intolerância à glicose persistiu e passou a coexistir com HOMA-IR e TyG elevados, HOMA- β

reduzido, maior triacilglicerolemia plasmática e adiposidade persistente nos animais SL, enquanto o fígado mantinha maior retenção de triacilglicerol e glicogênio e as alterações observadas no MG evidenciavam que a sobrecarga metabólica já alcançava diferentes compartimentos envolvidos na homeostase energética. Neste contexto de resistência à insulina mais estabelecida e maior exposição sistêmica aos lipídios, o MS, inicialmente mais preservado, passou a apresentar simultaneamente maior massa relativa e concentração de colesterol intramuscular. O colesterol exerce importante função estrutural na membrana muscular, e sua homeostase influencia propriedades de membrana e processos relacionados ao tráfego de GLUT4; experimentalmente, o excesso de colesterol em membranas do músculo esquelético tem sido associado à resistência à insulina, enquanto sua redução favorece a translocação desse transportador e a captação de glicose (Barrientos et al., 2017).

Portanto, tal mecanismo é uma possível explicação para a limitação de captação de glicose sinalizada precocemente no MS: enquanto no DPN 60 o menor direcionamento da glicose circulante para este músculo carecia de um substrato estrutural identificável, o acúmulo tardio de colesterol sobre essa membrana é plausível para explicar essa limitação, ao comprometer seu tráfego necessário à captação de glicose estimulada pela insulina. Trata-se do mesmo eixo colesterol-membrana-GLUT4 já discutido previamente para o MG, ainda que em sentidos opostos: enquanto naquele músculo a redução do colesterol pela vitC favoreceu a captação de glicose, no MS é o seu acúmulo, induzido pela supernutrição, que parece limitá-la (Habegger et al., 2012; Llanos et al., 2015; Fazakerley et al., 2019; Barrientos et al., 2017). Assim, o surgimento tardio do acúmulo de colesterol no MS, juntamente com a resistência à insulina sistêmica, indica que o perfil metabólico predominantemente oxidativo característico deste músculo, que pode ter contribuído para restringir a retenção lipídica no DPN 60, tornou-se progressivamente insuficiente frente à persistência da disfunção metabólica (Koves et al., 2008; Muoio & Neuffer, 2012; Petersen & Shulman, 2018). Sob essa perspectiva, a normalização das concentrações de glicose e glicogênio intramuscular observadas no DPN 90 não representa recuperação funcional, pois ocorreu em um músculo que simultaneamente apresentava expansão relativa e alteração de seu conteúdo lipídico.

Essa mudança metabólica e estrutural do MS ocorreu de forma integrada ao estabelecimento de um ambiente redox-inflamatório distinto daquele observado na avaliação inicial: no DPN 90, o aumento da massa relativa e do colesterol intramuscular coexistiu com maior atividade da MPO e carbonilação proteica nos animais SL, sem aumento detectável das defesas antioxidantes avaliadas. Essa convergência é mecanisticamente coerente, já que os neutrófilos constituem importante fonte enzimática de espécies oxidantes: a MPO utiliza H_2O_2 e íons cloreto para gerar ácido hipocloroso (HOCl) e outras EROs, compostos de elevada reatividade que têm as proteínas como um de seus principais alvos biológicos, promovendo oxidação direta de resíduos de aminoácidos, formação de cloraminas e consequentes modificações estruturais e funcionais (Hawkins et al., 2003; Pattison et al., 2007; Davies, 2011; Davies, 2021).

Além de atuar diretamente sobre proteínas, produtos derivados da MPO também reagem com ácidos graxos insaturados, fosfolipídios e colesterol, gerando lipídios oxidados e ERO secundárias capazes de ampliar indiretamente as modificações proteicas (Davies, 2011; Davies, 2021). Isso confere relevância ao aumento simultâneo do colesterol intramuscular observado no MS neste mesmo período, por adicionar um substrato lipídico sujeito à ação dessas EROs. Essa via mecanística é consistente com achados experimentais que associam a atividade da MPO ao comprometimento metabólico e à resistência à insulina em condições como a obesidade (Winterbourn et al., 2016; Zhao et al., 2020), reforçando que a maior infiltração neutrofílica no MS não constitui apenas um marcador inflamatório isolado, mas uma via ativa de geração de dano oxidativo.

É nesse contexto de vulnerabilidade temporal observada no MS dos animais com supernutrição lactacional que se inserem os efeitos da suplementação com vitC sobre esse músculo. Nos animais SL, os efeitos imediatos da vitC sobre este músculo avaliados no DPN 60, ocorreram integrados à melhora da homeostase glicêmica sistêmica e a uma reorganização simultânea do metabolismo glicídico e do ambiente redox muscular. A suplementação reduziu a glicemia e melhorou a tolerância à glicose especificamente nos animais submetidos à supernutrição neonatal, enquanto seus efeitos musculares foram mais abrangentes, com aumento da concentração de glicose no MG e redução do glicogênio no MS

independentemente da condição nutricional. Mecanicamente, a vitC é concentrada nos miócitos principalmente pelo SVCT2 e participa diretamente do controle do ambiente redox no qual operam a sinalização insulinêmica e o metabolismo energético (Savini et al., 2007; Mason et al., 2014). Experimentalmente, o aumento da disponibilidade de vitC tem sido associado à melhora da ação insulínica e disposição periférica de glicose, incluindo modificações do metabolismo não oxidativo e de propriedades de membrana, além de efeitos sobre a disposição muscular de glicose em condições de resistência à insulina (Paolisso et al., 1994; Natali et al., 2000; Mason et al., 2016).

Nos animais SL, esses mecanismos oferecem uma explicação plausível para a melhora da tolerância à glicose e redução da glicemia, enquanto o aumento de glicose no MG e a redução de glicogênio no MS demonstram que a suplementação também modificou, de maneira tecido-específica, seu destino muscular. No MS, contudo, essa reorganização glicídica ocorreu simultaneamente à redução de GSH e FRAP e ao aumento da atividade da MPO e da carbonilação proteica promovidos pela vitC, achados que seguem o mesmo padrão geral, não sendo restrito aos SL suplementados. Essa coexistência é fisiologicamente coerente porque a sinalização metabólica e o estado redox são processos estreitamente interdependentes: EROs participam fisiologicamente da sinalização da insulina, enquanto seu excesso ou persistência pode comprometer proteínas envolvidas nessa via, e modificações do fluxo e da utilização de substratos, por sua vez, alteram a produção mitocondrial de EROs e a demanda pelos sistemas antioxidantes celulares (Loh et al., 2009; Tiganis, 2011; Fisher-Wellman & Neuffer, 2012; Ristow & Schmeisser, 2014).

Essa maior sensibilidade redox do MS a alterações no manejo de substratos é, ainda, compatível com seu perfil contrátil: por se tratar de um músculo predominantemente tônico e rico em fibras oxidativas, o MS mantém um fluxo mitocondrial constitutivamente elevado e uma dependência contínua da oxidação de ácidos graxos (Hamilton et al., 2026), de modo que o redirecionamento no uso de substratos energéticos após a suplementação tende a amplificar a produção mitocondrial de EROs neste músculo, diferentemente do MG, cuja atividade contrátil

intermitente e perfil predominantemente glicolítico conferem menor dependência basal da oxidação lipídica (Hua et al., 2017).

É precisamente nesse contexto de maior dependência oxidativa basal que se inserem os achados redox observados no MS: a menor disponibilidade de GSH e o poder redutor avaliado pelo FRAP refletem a maior exigência sobre a capacidade redutora do MS durante esse rearranjo metabólico, enquanto o aumento da MPO adiciona uma fonte enzimática de oxidantes capazes de modificar proteínas, como já discutido previamente, o que fornece uma razão consistente para explicar a maior carbonilação proteica observada simultaneamente no MS (Hawkins et al., 2003; Pattison et al., 2007; Winterbourn et al., 2016; Davies, 2021). Dessa forma, os resultados do DPN 60, avaliação realizada imediatamente após o fim da intervenção, indicam que a vitC não atuou simplesmente como antioxidante no MS: ao mesmo tempo em que favoreceu a homeostase glicêmica dos animais SL e modificou o particionamento muscular da glicose, estabeleceu no MS uma nova configuração metabólico-redox, caracterizada por menor reserva glicídica, capacidade antioxidante disponível e maior atividade pró-oxidativa associada à MPO, o que se traduziu em dano oxidativo proteico.

Após 30 dias do término suplementar, no DPN 90, a permanência de efeitos da vitC em diferentes compartimentos propõe que a intervenção peripuberal impactou metabolicamente de forma duradoura, e não somente evidenciando respostas dependentes da presença imediata da vitC exógena. Nos animais SL, a vitC melhorou a tolerância à glicose, reduziu o ganho de peso, a adiposidade e a retenção hepática de triacilglicerol e glicogênio, achados previamente discutidos; no MS, por sua vez, a resposta tardia não envolveu alterações da massa relativa ou das concentrações intramusculares dos substratos avaliados, concentrando-se na homeostase redox-inflamatória: a vitC aumentou o marcador de produção de EROs e a capacidade antioxidante total tecidual, reduziu a atividade da MPO, especificamente nos SL, e promoveu maior carbonilação proteica em todos os suplementados. Embora ratos sintetizem vitC endogenamente, sua concentração corporal é regulada dinamicamente pelo equilíbrio entre síntese, aporte, utilização e excreção (Lykkesfeldt & Tveden-Nyborg, 2019; Przybyło & Langner, 2020).

Durante a suplementação diária, a exposição consecutiva somou-se a essa produção endógena, colocando o MS (cujo perfil oxidativo já foi discutido) sob um ambiente redox persistentemente modificado, o que torna plausível uma reorganização da relação entre geração e neutralização de EROs neste tecido de intensa troca de equivalentes redutores (Picard et al., 2012). Essa exposição já se refletia imediatamente após a intervenção e permaneceu detectável mesmo 30 dias após seu término, independentemente da condição nutricional neonatal, padrão compatível com a persistência e remoção incompleta de proteínas carboniladas, que apresentam taxas distintas de turnover e degradação (Fedorova et al., 2014).

Nos animais SL, essa resposta redox tardia ocorreu apesar da vitC ter atenuado o fenótipo metabólico programado nos aspectos já discutidos (tolerância à glicose, adiposidade, ganho de peso e retenção hepática de substratos). Assim, o aumento da produção de ERO intramuscular especificamente nestes animais suplementados não deve ser interpretado simplesmente como consequência da progressão da resistência insulínica ou da sobrecarga metabólica sistêmica, uma vez que inúmeros destes parâmetros foram simultaneamente atenuados pela intervenção antioxidante. Em vez disso, o achado aponta para uma resposta particular do MS à vitC, relacionada ao perfil metabólico já discutido deste músculo (Espinosa et al., 2013; Souto Padron de Figueiredo et al., 2015).

O aumento simultâneo da capacidade antioxidante total tecidual confirma que essa resposta não foi passiva: o sistema antioxidante do MS foi efetivamente mobilizado frente à maior pressão oxidativa, o que reforça a interpretação de uma vulnerabilidade tecidual específica (Andrich et al., 2018). Vale ressaltar que a carbonilação proteica persistiu não por ausência de resposta antioxidante, mas porque a magnitude da pressão pró-oxidante superou sua capacidade de neutralização, cenário também descrito no MS de ratos frente a outras formas de sobrecarga oxidativa (Andrich et al., 2018). Essa mesma especificidade se repete na atividade da MPO: sua redução pela vitC, restrita aos SL, correspondendo à atenuação de uma fonte inflamatória de oxidantes que se encontrava elevada nos SL-veículo. Vale ressaltar que esse achado tem caráter pontual e tecido-específico, não comprometendo o quadro geral de atenuação sistêmica e teciduais da suplementação com vitC sobre os animais com

supernutrição lactacional. Uma possível explicação para essa especificidade está na cinética diferencial de captação de vitC entre os tecidos: o transportador SVCT2 é preferencialmente expresso em fibras oxidativas lentas, como as predominantes no MS, padrão conservado entre espécies e associado a maior atividade basal de NADPH oxidase neste músculo em comparação ao MG (Sandoval et al., 2024).

Essa maior capacidade de captação, somada à elevada atividade oxidativa basal do MS já discutida, pode propiciar um maior acúmulo intracelular de vitC especificamente nele, aumentando a exposição local às reações do tipo Fenton mediadas por metais de transição, sendo uma explicação plausível para o aumento da carbonilação proteica evidenciado neste músculo (Palamanda; Kehrer, 1992; Miyata et al., 1998; Kryndushkin et al., 2016; Kaźmierczak-Barańska et al., 2020). Tal processo pode ocorrer sem que se replique necessariamente em tecidos com cinética de captação e perfil enzimático distintos, como o fígado e até o MG. Assim, tais achados indicam a coexistência pontual, no MS, de duas vias de oxidação proteica: uma enzimática, mediada pela MPO, restrita aos SL e sensível à ação da vitC (Peskin et al., 2025); e outra não enzimática, decorrente da maior captação intracelular de vitC (Sandoval et al., 2024) e da elevada atividade oxidativa basal deste músculo, que juntas ampliam a exposição a reações pró-oxidantes (Palamanda & Kehrer, 1992; Miyata et al., 1998; Kryndushkin et al., 2016; Kaźmierczak-Barańska et al., 2020).

Nos animais NL, a vitC também modificou o MS, mas de forma dissociada da presença de qualquer desafio metabólico prévio: no DPN 60, reduziu a glicose e o glicogênio intramusculares e defesas antioxidantes específicas (GSH, FRAP), ao mesmo tempo em que aumentou a MPO e a carbonilação proteica, um custo redox parcialmente compensado pelo aumento da atividade da SOD, exclusivo neste grupo suplementado. No DPN 90, isso não se dissipou, mas mudou de formato: a massa relativa e a atividade da MPO aumentaram especificamente nos NL suplementados, em direção oposta à observada nos SL, enquanto a carbonilação proteica permaneceu elevada e nenhuma defesa antioxidante foi mobilizada. Assim, em um organismo sem disfunção metabólica a ser corrigida, a vitC parece atuar sobre o MS como um estressor redox, achado consistente com o mesmo perfil tecido-específico já discutido para os animais SL, no qual a maior

afinidade transportadora do MS pela vitC, aliada ao seu fluxo oxidativo constitutivamente elevado, predispõe este músculo a reações do tipo Fenton (já previamente discutida) independentemente do estado metabólico de base.

Tal interpretação converge com estudos anteriores que demonstram que a suplementação antioxidante pode prejudicar adaptações fisiológicas em tecido metabolicamente saudável (Gomez-Cabrera et al., 2008; Ristow & Schmeisser, 2014), assim como com evidências de que a vitC assume atividade pró-oxidante sobre a função neutrofílica em concentrações elevadas (Sae-khow et al., 2023). Contudo, a persistência desse padrão redox-inflamatório evidenciado na avaliação tardia é compatível com um fenômeno de memória metabólica: o estresse redox transitório induzido pela suplementação com vitC durante a puberdade sobre o MS pode ter desencadeado modificações duradouras na expressão de genes relacionados à defesa antioxidante e à sinalização inflamatória, que se mantêm mesmo após a eliminação do estímulo original. Esse é um mecanismo já descrito para outras intervenções metabólicas transitórias (Dong et al., 2024). Nesse sentido, a ausência de compensação pela atividade da SOD no DPN 90, distinta da resposta observada no DPN 60, propõe que essa memória redox se sobrepõe à capacidade adaptativa do MS, tornando esse desequilíbrio ainda mais evidente na avaliação tardia.

Considerados em conjunto, os resultados deste estudo evidenciam que as consequências da supernutrição neonatal ultrapassam a persistência de um fenótipo de obesidade, envolvendo uma desregulação progressiva da homeostase metabólica que assume diferentes expressões nos compartimentos avaliados ao longo do desenvolvimento. Essa dinâmica indica que a programação nutricional precoce não constitui um estado metabólico estático, mas um processo cujas manifestações sistêmicas, hepáticas e musculares se modificam e agravam ao longo do tempo. Nessa conjuntura, um dos principais achados do presente trabalho reside na capacidade da intervenção peripuberal com vitC de interferir para além do período de suplementação.

Os efeitos identificados 30 dias após seu término, particularmente sobre componentes do fenótipo de obesidade programado pela supernutrição neonatal, indicam que a puberdade é período de plasticidade no qual percursos estabelecidos

precocemente ainda podem ser redirecionados. Essa mesma plasticidade, contudo, parece envolver também um componente de risco: achados pontuais sugerem que o estresse redox transitório induzido pela própria suplementação em tecidos específicos pode persistir para além do período de intervenção, indicando que a puberdade não apenas permite redirecionar trajetórias metabólicas estabelecidas precocemente, mas também pode, em certa medida, fixar modificações induzidas pela própria intervenção. Assim, a diversidade de respostas entre as condições nutricionais neonatais, entre os tecidos e entre os períodos avaliados evidencia que a atuação da suplementação com vitC não pode ser compreendida exclusivamente a partir de sua propriedade antioxidante, mas deve ser considerada em função do contexto metabólico sobre o qual atua. Este estudo amplia, assim, a compreensão da obesidade precoce ao revelar tanto a natureza dinâmica de sua programação quanto a possibilidade de intervir sobre essa trajetória durante uma relevante janela do desenvolvimento, preenchendo uma lacuna ainda pouco explorada na literatura.

7. CONCLUSÃO

Este estudo elucidou que a supernutrição neonatal induzida pela redução do tamanho da ninhada programou um fenótipo persistente de obesidade e disfunção metabólica, marcado pela progressão do comprometimento glicêmico e por repercussões distintas no fígado e no músculo esquelético ao longo do desenvolvimento. A suplementação com vitC durante o período peripuberal atenuou componentes relevantes deste fenótipo, com redução tardia da adiposidade, melhora da tolerância à glicose e menor acúmulo intra-hepático de substratos nos animais submetidos à supernutrição neonatal. Entretanto, a diversidade das respostas metabólicas, redox e inflamatórias, incluindo manifestações pró-oxidantes em condições específicas, evidencia que seus efeitos são condicionados pelo estado metabólico prévio, tecido e momento avaliado. Trata-se de uma abordagem pioneira ao avaliar uma intervenção com dose fixa de vitC especificamente durante a puberdade, ainda pouco explorada na literatura. A persistência de repercussões tardias, ou seja, após 30 dias do fim da suplementação, destaca o período peripuberal como uma janela relevante para intervenções sobre alterações estabelecidas no início da vida. Assim, o presente trabalho fornece novas evidências

sobre os efeitos da vitC em um modelo de programação metabólica e estabelece bases para investigações futuras voltadas à definição de doses e de mecanismos capazes de potencializar seus efeitos benéficos e limitar respostas indesejáveis.

Referências

- ABDEL-WAHAB, Y. H. A. et al. **Vitamin C supplementation decreases insulin glycation and improves glucose homeostasis in obese hyperglycemic (ob/ob) mice.** *Metabolism*, v. 51, n. 4, p. 514–517, 2002.
- ADAMS, J. M. et al. **Ceramide content is increased in skeletal muscle from obese insulin-resistant humans.** *Diabetes*, v. 53, n. 1, p. 25–31, 2004.
- AEBI, H. **Catalase.** In: BERGMAYER, H. U. (ed.). *Methods of Enzymatic Analysis*. 2. ed. New York: Academic Press, 1974. v. 2, p. 673-684.
- AKAGAWA, M. **Protein carbonylation: Molecular mechanisms, biological implications, and analytical approaches.** *Free Radical Research*, Abingdon, v. 55, n. 4, p. 307–320, 2021.
- ALLARD, C. et al. **mTORC1 in energy expenditure: consequences for obesity.** *Nature Reviews Endocrinology*, London, v. 20, n. 4, p. 239–251, 2024.
- ANDERSON, E. J. et al. **Mitochondrial H₂O₂ emission and cellular redox state link excess fat intake to insulin resistance in both rodents and humans.** *The Journal of Clinical Investigation*, v. 119, n. 3, p. 573–581, 2009.
- ANDRICH, D. E. et al. **Altered lipid metabolism impairs skeletal muscle force in young rats submitted to a short-term high-fat diet.** *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 1327, 2018.
- ANDRICH, D. E. et al. **A short-term high-fat diet alters glutathione levels and IL-6 gene expression in oxidative skeletal muscles of young rats.** *Frontiers in Physiology*, v. 10, p. 372, 2019.
- ASTERHOLM, I. W. et al. **Adipocyte inflammation is essential for healthy adipose tissue expansion and remodeling.** *Cell Metabolism*, v. 20, n. 1, p. 103–118, 2014.
- AUMAILLEY, L. et al. **Combined transcriptomics and proteomics unveil the impact of vitamin C in modulating specific protein abundance in the mouse liver.** *Biological Research*, Santiago, v. 57, art. 26, 2024.
- BARKER, D. J. P. **The developmental origins of adult disease.** *Journal of the American College of Nutrition*, v. 23, n. 6, Suppl., p. 588S-595S, 2004.
- BARRIENTOS, G et al. **Membrane cholesterol in skeletal muscle: a novel player in excitation-contraction coupling and insulin resistance.** *Journal of Diabetes Research*, London, v. 2017, art. 3941898, 2017.
- BEALS, J. W. et al. **Increased adipose tissue fibrogenesis, not impaired expandability, is associated with nonalcoholic fatty liver disease.** *Hepatology*, v. 74, n. 3, p. 1287–1299, 2021.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay.** *Analytical Biochemistry*, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996.
- BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; GATTO JUNIOR, G. J.; STRYER, L. **Biochemistry**. 9. ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2019.

- BERNARDIS, L. L.; Patterson, B. D. **Correlation between Lee index and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions.** *Journal of Endocrinology*, v. 40, n. 4, p. 527–528, 1968.
- BETTERIDGE, D. John. **What is oxidative stress?** *Metabolism: Clinical and Experimental*, New York, v. 49, n. 2, Suppl. 1, p. 3–8, 2000.
- BISWAS, N. M.; CHAUDHURI, A.; SARKAR, M.; BISWAS, R. **Effect of ascorbic acid on in vitro synthesis of testosterone in rat testis.** *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 34, n. 6, p. 612–613, 1996.
- BLÜHER, M. **Obesity: global epidemiology and pathogenesis.** *Nature Reviews Endocrinology*, London, v. 15, n. 5, p. 288–298, 2019.
- BO, T. et al. **Hepatic selective insulin resistance at the intersection of insulin signaling and metabolic dysfunction-associated steatotic liver disease.** *Cell Metabolism*, Cambridge, v. 36, n. 5, p. 947–968, 2024.
- BOON, J. et al. **Ceramides contained in LDL are elevated in type 2 diabetes and promote inflammation and skeletal muscle insulin resistance.** *Diabetes*, v. 62, n. 2, p. 401–410, 2013.
- BOULLU-CIOCCA, S. et al. **Postnatal diet-induced obesity in rats upregulates systemic and adipose tissue glucocorticoid metabolism during development and in adulthood: its relationship with the metabolic syndrome.** *Diabetes*, v. 54, n. 1, p. 197–203, 2005.
- BOURBOUZE, R. et al. **N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) isoenzymes release from human monocyte-derived macrophages in response to zymosan and human recombinant interferon-gamma.** *Clinica Chimica Acta*, v. 199, n. 2, p. 185–194, 1991.
- BRADFORD, M. M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** *Journal of Investigative Dermatology*, New York, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.
- BRUNETTA, H. S. et al. **Decrement in resting and insulin-stimulated soleus muscle mitochondrial respiration is an early event in diet-induced obesity in mice.** *Experimental Physiology*, v. 104, n. 3, 2019.
- BULDUK, E.; GÖNÜL, B.; ÖZER, Ç. **Effects of vitamin C on muscle glycogen and oxidative events in experimental diabetes.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 292, n. 1-2, p. 131–137, 2006.
- BURTON, J. J. N.; ALONSO, L. C. **Overnutrition in the early postnatal period influences lifetime metabolic risk: evidence for impact on pancreatic β -cell mass and function.** *Journal of Diabetes Investigation*, v. 15, n. 3, p. 263–274, 2024.
- CABOT, C. et al. **Effect of cafeteria diet feeding on soleus intramyocellular lipid of Wistar rats.** *Journal of Obesity and Eating Disorders*, v. 2, n. 1, p. 1–8, 2012.
- CARR, Anita C.; MAGGINI, Silvia. **Vitamin C and immune function.** *Nutrients*, Basel, v. 9, n. 11, p. 1211, 2017.
- CARR, Anita C.; VISSERS, Margreet C. M. **Synthetic or food-derived vitamin C—are they equally bioavailable?** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Amsterdam, v. 1830, n. 12, p. 6490–6498, 2013.
- CARR, T P.; ANDRESEN, C J.; RUDEL, L L. **Enzymatic determination of triglyceride, free cholesterol, and total cholesterol in tissue lipid extracts.** *Clinical Biochemistry*, v. 26, p. 39–42, 1993.

- DA EIRA, D. et al. **Sucrose-enriched and carbohydrate-free high-fat diets distinctly affect substrate metabolism in oxidative and glycolytic muscles of rats.** *Nutrients*, v. 16, n. 2, p. 286, 2024.
- DAEMEN, S. et al. **Dynamic shifts in the composition of resident and recruited macrophages influence tissue remodeling in NASH.** *Cell Reports*, Cambridge, v. 34, n. 2, art. 108626, 2021.
- DALLE-DONNE, I. et al. **Protein carbonylation in human diseases.** *Trends in Molecular Medicine*, Oxford, v. 9, n. 4, p. 169-176, 2003.
- DAVIES, M. J. **Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention.** *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 48, n. 1, p. 8-19, 2011.
- DAVIES, M. J. **Myeloperoxidase: mechanisms, reactions and inhibition as a therapeutic strategy in inflammatory diseases.** *Pharmacology & Therapeutics*, v. 218, p. 107685, 2021.
- DEAN, R. T.; HYLTON, W.; ALLISON, A. C. **Lysosomal enzyme secretion by macrophages during intracellular storage of particles.** *Biochimica et Biophysica Acta*, Amsterdam, v. 584, n. 1, p. 57-65, 1979.
- DEFRONZO, R. A.; TRIPATHY, D. **Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes.** *Diabetes Care*, Alexandria, v. 32, Suppl. 2, p. S157-S163, 2009.
- DE SOUZA, C. F. et al. **Glucocorticoids contribute to metabolic and liver impairments induced by lactation overnutrition in male adult rats.** *Frontiers in Physiology*, v. 14, art. 1161582, 2023.
- DIEUDONNÉ, M. N et al. **Opposite effects of androgens and estrogens on adipogenesis in rat preadipocytes: evidence for sex and site-related specificities and possible involvement of insulin-like growth factor 1 receptor and peroxisome proliferator-activated receptor γ 2.** *Endocrinology*, v. 141, n. 2, p. 649-656, 2000.
- DONG, H. et al. **Metabolic memory: mechanisms and diseases.** *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 9, art. 38, 2024.
- DONG, Y et al. **Impaired adipose expansion caused by liver X receptor activation is associated with insulin resistance in mice fed a high-fat diet.** *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 58, n. 3, p. 141-154, 2017.
- DOSEDÉL, M. et al. **Vitamin C-sources, physiological role, kinetics, deficiency, use, toxicity, and determination.** *Nutrients*, v. 13, n. 2, p. 615, 2021.
- DREHMER, E. et al. **Oxygenic metabolism in nutritional obesity induced by olive oil: the influence of vitamin C.** *Food & Function*, Cambridge, v. 10, n. 6, p. 3567-3580, 2019. (a)
- DREHMER, Marina et al. **Association of vitamin C status with lipid profile: a systematic review and meta-analysis.** *Nutrition Reviews*, Oxford, v. 77, n. 8, p. 541-551, 2019. (b)
- ESPINOSA, A. et al. **Insulin-dependent H₂O₂ production is higher in muscle fibers of mice fed with a high-fat diet.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 14, n. 8, p. 15740-15754, 2013.
- FAZAKERLEY, D. J. et al **Muscle and adipose tissue insulin resistance: malady without mechanism?** *Journal of Lipid Research*, v. 60, n. 10, p. 1720-1732, 2019.
- FEDERICI, G., Shaw, B.J., Handy, R.D. **Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects.** *Aquat. Toxicol.* 84, 415-430, 2007.

- FEDOROVA, M.; BOLLINENI, R. C.; HOFFMANN, R. **Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies.** *Mass Spectrometry Reviews*, Hoboken, v. 33, n. 2, p. 79–97, 2014.
- FERNANDES, Glauro S. A. et al. **Vitamin C partially attenuates male reproductive deficits in hyperglycemic rats.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, London, v. 9, art. 100, 2011.
- FINK, L. N. et al. **Pro-inflammatory macrophages increase in skeletal muscle of high fat-fed mice and correlate with metabolic risk markers in humans.** *Obesity*, v. 22, n. 3, p. 747–757, 2014.
- FISCHER, S. V et al. **Swimming training prevents obesity installation and normalizes hypothalamic expressions of GLP1 and leptin receptors in adult offspring born in small litters.** *Einstein (São Paulo)*, v. 22, eAO0619, 2024.
- FISHER-WELLMAN, K. H.; NEUFER, P. D. **Linking mitochondrial bioenergetics to insulin resistance via redox biology.** *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 23, n. 3, p. 142-153, 2012.
- FLEMING, T. P. et al. **Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences.** *The Lancet*, London, v. 391, n. 10132, p. 1842-1852, 2018.
- FRANKE, S. I. R. et al. **Influence of hesperidin and vitamin C on glycemic parameters, lipid profile, and DNA damage in rats treated with sucrose overload.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 2018.
- FRAYN, K. N. **Adipose tissue as a buffer for daily lipid flux.** *Diabetologia*, v. 45, n. 9, p. 1201–1210, 2002
- FUENTE-MARTÍN, E. et al. **Early postnatal overnutrition increases adipose tissue accrual in response to a sucrose-enriched diet.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 302, n. 12, p. E1586-E1598, 2012.
- FURUKAWA, S. et al. **Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome.** *The Journal of Clinical Investigation*, Ann Arbor, v. 114, n. 12, p. 1752–1761, 2004.
- GARCÍA-BERUMEN, C. I. et al. **Avocado oil alleviates non-alcoholic fatty liver disease by improving mitochondrial function, oxidative stress and inflammation in rats fed a high fat-high fructose diet.** *Frontiers in Pharmacology*, 2023.
- GARCÍA-BERUMEN, C. I. et al. **The severity of rat liver injury by fructose and high fat depends on the degree of respiratory dysfunction and oxidative stress induced in mitochondria.** *Lipids in Health and Disease*, v. 18, art. 78, 2019.
- GARCIA-DIAZ, D. F. et al. **Ascorbic acid oral treatment modifies lipolytic response and behavioural activity but not glucocorticoid metabolism in cafeteria diet-fed rats.** *Acta Physiologica*, Oxford, v. 195, n. 4, p. 449–457, 2009.
- GBD 2021 ADOLESCENT BMI COLLABORATORS. **Global, regional, and national prevalence of child and adolescent overweight and obesity, 1990–2021, with forecasts to 2050: a forecasting study for the Global Burden of Disease Study 2021.** *The Lancet*, London, v. 405, n. 10481, p. 785–812, 2025.
- GEȢOTEK, A.; SKRZYDLEWSKA, E. **Antioxidative and anti-inflammatory activity of ascorbic acid.** *Antioxidants*, v. 11, n. 10, art. 1993, 2022.
- GILBERT, M. **Role of skeletal muscle lipids in the pathogenesis of insulin resistance of obesity and type 2 diabetes.** *Journal of Diabetes Investigation*, v. 12, n. 11, p. 1934–1941, 2021.
- GOMEZ-CABRERA, M. C. et al. **Oral administration of vitamin C decreases muscle mitochondrial biogenesis and hampers training-induced adaptations in**

- endurance performance.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 87, n. 1, p. 142–149, 2008.
- GRĂDINARU, A. C.; POPA, S. **Vitamin C: from self-sufficiency to dietary dependence in the framework of its biological functions and medical implications.** *Life*, v. 15, n. 2, art. 238, 2025.
- GUERRERO-ROMERO, F. et al. **The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity: comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Oxford, v. 95, n. 7, p. 3347–3351, 2010.
- HA, A. W.; HAN, G. J.; KIM, W. K. **Effect of retrograded rice on weight control, gut function, and lipid concentrations in rats.** *Nutrition Research and Practice*, v. 6, n. 1, p. 16–20, 2012.
- HABEGGER, K. M. et al. **Fat-induced membrane cholesterol accrual provokes cortical filamentous actin destabilisation and glucose transport dysfunction in skeletal muscle.** *Diabetologia*, v. 55, n. 2, p. 457–467, 2012.
- HABBOU, A.; LI, N.; ROCHETTE, L.; VERGELY, C. **Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences.** *The Journal of Nutrition*, v. 143, n. 5, p. 553–562, 2013.
- HALLIWELL, B. **Understanding mechanisms of antioxidant action in health and disease.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 25, p. 13–33, 2024.
- HAMILTON, M. T. et al. **The distinct molecular and cardiometabolic characteristics of the soleus and slow oxidative muscle enhancing chronic disease prevention and healthy aging.** *Frontiers in Endocrinology*, v. 17, art. 1911333, 2026.
- HANSON, M. A.; GLUCKMAN, P. D. **Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology?** *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 94, n. 4, p. 1027–1076, 2014.
- HAWKINS, C. L.; PATTISON, D. I.; DAVIES, M. J. **Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins.** *Amino Acids*, v. 25, n. 3–4, p. 259–274, 2003.
- HAYASAKI, H. **Distribution of myofiber types in the rat hindlimb muscles.** *The Anatomical Record*, New York, v. 260, n. 1, p. 42–49, 2001.
- HEINDEL, J. J. et al. **Developmental Origins of Health and Disease: integrating environmental influences.** *Endocrinology*, v. 156, n. 10, p. 3416–3421, 2015.
- HOFFMAN, D. J.; POWELL, T. L.; BARRETT, E. S.; HARDY, D. B. **Developmental origins of metabolic diseases.** *Physiological Reviews*, v. 101, n. 3, p. 739–795, 2021.
- HOLTRUP, B. et al. **Puberty is an important developmental period for the establishment of adipose tissue mass and metabolic homeostasis.** *Adipocyte*, v. 6, n. 3, p. 224–233, 2017.
- HOTAMISLIGIL, G. S. **Inflammation and metabolic disorders.** *Nature*, London, v. 444, n. 7121, p. 860–867, 2006.
- HOU, M. et al. **Neonatal overfeeding induced by small litter rearing causes altered glucocorticoid metabolism in rats.** *PLoS ONE*, v. 6, n. 11, e25726, 2011.
- HUA, N. et al. **Influence of muscle fiber type composition on early fat accumulation under high-fat diet challenge.** *PLOS ONE*, v. 12, n. 8, art. e0182430, 2017.

- HUTCHINSON, A. L. et al. **n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids modulate macrophage–myocyte inflammatory crosstalk and improve myocyte insulin sensitivity.** *Nutrients*, v. 16, n. 13, art. 2086, 2024.
- IRIMIA, J. M. et al. **Lack of liver glycogen causes hepatic insulin resistance and steatosis in mice.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 292, n. 25, p. 10455–10464, 2017.
- JANI, S. et al. **Distinct mechanisms involving diacylglycerol, ceramides, and inflammation underlie insulin resistance in oxidative and glycolytic muscles from high fat-fed rats.** *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 19160, 2021.
- JANI, S.; DA EIRA, D.; CEDDIA, R. B. **Insulin-resistant female rat skeletal muscles display diacylglycerol-mediated protein kinase C activation and inflammation without ceramide accumulation.** *The Journal of Physiology*, v. 601, n. 10, p. 1745–1759, 2023.
- JEON, S. et al. **Ascorbic acid reduces insulin resistance and pancreatic steatosis by regulating adipocyte hypertrophy in obese ovariectomized mice.** *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, Ottawa, v. 101, n. 6, p. 294–303, 2023.
- JIANG, C.-L.; TSAO, C.-Y.; LEE, Y.-C. **Vitamin C attenuates predisposition to high-fat diet-induced metabolic dysregulation in GLUT10-deficient mouse model.** *Genes & Nutrition*, London, v. 17, art. 10, 2022.
- JONES, D. P. **Radical-free biology of oxidative stress.** *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Bethesda, v. 295, n. 4, p. C849–C868, 2008.
- JOHNSTON, C. S.; CORTE, C.; SWAN, P. D. **Marginal vitamin C status is associated with reduced fat oxidation during submaximal exercise in young adults.** *Nutrition & Metabolism*, v. 3, art. 35, 2006.
- KANEKO, S et al. **Changes in triacylglycerol-accumulated fiber type, fiber type composition, and biogenesis in the mitochondria of the soleus muscle in obese rats.** *The Anatomical Record*, Hoboken, v. 294, n. 11, p. 1904–1912, 2011.
- KAŹMIERCZAK-BARAŃSKA, J. et al. **Two faces of vitamin C: antioxidative and pro-oxidative agent.** *Nutrients*, v. 12, n. 5, art. 1501, 2020.
- KEARNS, S. R. et al. **Oral vitamin C reduces the injury to skeletal muscle caused by compartment syndrome.** *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, v. 86, n. 6, p. 906–911, 2004.
- KONO, Y. **Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 186, n. 1, p. 189–195, 1978.
- KORENBLAT, K. M.; FABBRINI, E.; MOHAMMED, B. S.; KLEIN, S. **Liver, muscle, and adipose tissue insulin action is directly related to intrahepatic triglyceride content in obese subjects.** *Gastroenterology*, v. 134, n. 5, p. 1369–1375, 2008.
- KOTIKALAPUDI, N. et al. **Acute regulation of murine adipose tissue lipolysis and insulin resistance by the TGF β superfamily protein GDF3.** *Nature Communications*, v. 16, art. 4432, 2025.
- KOVES, T. R. et al. **Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance.** *Cell Metabolism*, Cambridge, v. 7, n. 1, p. 45–56, 2008.
- KRYNDUSHKIN, D.; RAO, V. A. **Comparative effects of metal-catalyzed oxidizing systems on carbonylation and integrity of therapeutic proteins.** *Pharmaceutical Research*, v. 33, n. 2, p. 526–539, 2016.

- KUBOTA, N. et al. **Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity.** *Nature Communications*, v. 7, art. 12977, 2016.
- LLANOS, P. et al. **The cholesterol-lowering agent methyl- β -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 308, n. 4, p. E294-E305, 2015.
- LEE, H. et al. **Ascorbic acid inhibits visceral obesity and nonalcoholic fatty liver disease by activating peroxisome proliferator-activated receptor α in high-fat-diet-fed C57BL/6J mice.** *International Journal of Obesity*, London, v. 43, n. 8, p. 1620–1630, 2019.
- LEE, S.-W. et al. **Mega-dose vitamin C ameliorates nonalcoholic fatty liver disease in a mouse fast-food diet model.** *Nutrients*, Basel, v. 14, n. 11, art. 2195, 2022.
- LEE, Sang Min et al. **Vitamin C supplementation improves metabolic and inflammatory profiles in experimental obesity.** *Nutrients*, Basel, v. 10, n. 11, art. 1714, 2018.
- LEE, S.-H.; PARK, S.-Y.; CHOI, C. S. **Insulin resistance: from mechanisms to therapeutic strategies.** *Diabetes & Metabolism Journal*, v. 46, p. 15-31, 2022.
- LEE, Yun Sok; OLEFSKY, Jerrold M. **Chronic tissue inflammation and metabolic disease.** *Genes & Development*, Cold Spring Harbor, v. 35, n. 5–6, p. 307–328, 2021.
- LEFERE, S.; TACKE, F. **Macrophages in obesity and non-alcoholic fatty liver disease: crosstalk with metabolism.** *JHEP Reports*, v. 1, n. 1, p. 30–43, 2019.
- LEFORT, Karli R. et al. **Contributing roles of mitochondrial dysfunction and hepatocyte apoptosis in liver diseases through oxidative stress, post-translational modifications, inflammation, and intestinal barrier dysfunction.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, Cham, v. 81, n. 1, art. 34, 2024.
- LE THUC, Ophélie; GARCÍA-CÁCERES, Cristina. **Obesity-induced inflammation: connecting the periphery to the brain.** *Nature Metabolism*, London, v. 6, p. 1237–1252, 2024.
- LINSTER, C. L.; VAN SCHAFTINGEN, E. **Vitamin C: biosynthesis, recycling and degradation in mammals.** *The FEBS Journal*, Oxford, v. 274, n. 1, p. 1-22, 2007.
- LISTENBERGER, L. L. et al. **Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 6, p. 3077–3082, 2003.
- LIU, H.-W. et al. **Developmental programming in skeletal muscle in response to overnourishment in the immediate postnatal life in rats.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 24, n. 11, p. 1859–1869, 2013.
- LIU, Li et al. **Upregulation of myocellular DGAT1 augments triglyceride synthesis in skeletal muscle and protects against fat-induced insulin resistance.** *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, n. 6, p. 1679–1689, 2007.
- LOH, K. et al. **Reactive oxygen species enhance insulin sensitivity.** *Cell Metabolism*, v. 10, n. 4, p. 260-272, 2009.
- LU, S. C. **Glutathione synthesis.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1830, n. 5, p. 3143–3153, 2013.
- LYKKESFELDT, Jens; CARR, Anitra C. **Vitamin C in human health: perspectives on physiology, pharmacology and clinical applications.** *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 225, p. 1–19, 2024.

- LYKKESFELDT, J.; TVEDEN-NYBORG, P. **The pharmacokinetics of vitamin C.** *Nutrients*, Basel, v. 11, n. 10, art. 2412, 2019.
- MALAFIA, A. B. et al. **Obesity induction with high fat sucrose in rats.** *ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, v. 26, supl. 1, p. 17–21, 2013.
- MARANGON, P. B. et al. **Perinatal over- and underfeeding affect hypothalamic leptin and ghrelin neuroendocrine responses in adult rats.** *Physiology & Behavior*, v. 215, art. 112793, 2020.
- MASARONE, M. et al. **Role of oxidative stress in pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2018, art. 9547613, 2018.
- MASON, S. A. et al. **High-dose vitamin C supplementation increases skeletal muscle vitamin C concentration and SVCT2 transporter expression but does not alter redox status in healthy males.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 77, p. 130–138, 2014.
- MASON, S. A. et al. **Ascorbic acid supplementation improves skeletal muscle oxidative stress and insulin sensitivity in people with type 2 diabetes: findings of a randomized controlled study.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 93, p. 227–238, 2016.
- MATTHEWS, D. R. et al. **Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man.** *Diabetologia*, Berlin, v. 28, n. 7, p. 412–419, 1985.
- MEISTER, A. **Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 9397–9400, 1994.
- MINEHIRA, K. et al. **Blocking VLDL secretion causes hepatic steatosis but does not affect peripheral lipid stores or insulin sensitivity in mice.** *Journal of Lipid Research*, v. 49, n. 9, p. 2038–2044, 2008.
- MIYATA, T. et al. **Accumulation of carbonyls accelerates the formation of pentosidine, an advanced glycation end product: carbonyl stress in uremia.** *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 9, n. 12, p. 2349–2356, 1998.
- MIYATA, T. et al. **Generation of protein carbonyls by glycoxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids.** *FEBS Letters*, Amsterdam, v. 437, n. 1–2, p. 24–28, 1998.
- MOLDOGAZIEVA, N. T. et al. **Lipid peroxidation: reactive carbonyl species, protein/DNA adducts, and signaling switches in oxidative stress and cancer.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 663, p. 149167, 2023.
- MORALES, P. E. et al. **Muscle type-specific mitochondrial adaptation to high-fat diet relies on differential autophagy modulation.** *FASEB Journal*, v. 35, n. 10, e21912, 2021.
- MORALES, P. E. et al. **Skeletal muscle type-specific mitochondrial adaptation to high-fat diet relies on differential autophagy modulation.** *The FASEB Journal*, v. 35, 2021.
- MOREAU, R.; PÉRIANIN, A.; ARROYO, V. **Review of defective NADPH oxidase activity and myeloperoxidase release in neutrophils from patients with cirrhosis.** *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 10, art. 1044, 2019.
- MORGAN, Michael J.; LIU, Zheng-Gang. **Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling.** *Cell Research*, Beijing, v. 21, n. 1, p. 103–115, 2011.
- MUECKLER, M.; Thorens, B. **The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters.** *Molecular Aspects of Medicine*, v. 34, n. 2–3, p. 121–138, 2013.

- MUOIO, D. M.; NEUFER, P. D. **Lipid-induced mitochondrial stress and insulin action in muscle.** *Cell Metabolism*, Cambridge, v. 15, n. 5, p. 595–605, 2012.
- MURUGESAN, P.; MUTHUSAMY, T.; BALASUBRAMANIAN, K.; ARUNAKARAN, J. **Effects of vitamins C and E on steroidogenic enzymes mRNA expression in polychlorinated biphenyl (Aroclor 1254) exposed adult rat Leydig cells.** *Toxicology*, v. 232, n. 3, p. 170–182, 2007.
- NAIM, M. et al. **Effects of unpalatable diets and food restriction on feed efficiency in growing rats.** *Physiology & Behavior*, v. 25, n. 5, p. 609–614, 1980.
- NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES, ENGINEERING, AND MEDICINE.** *The Promise of Adolescence: Realizing Opportunity for All Youth*. Washington, DC: The National Academies Press, 2019.
- NATALI, A. et al. **Effect of vitamin C on forearm blood flow and glucose metabolism in essential hypertension.** *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 20, n. 11, p. 2401–2406, 2000.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry.** 8th ed. New York: W. H. Freeman, 2021.
- NOZAKI, Y. et al. **Metabolic control analysis of hepatic glycogen synthesis in vivo.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 117, n. 15, p. 8166–8176, 2020.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE.** *Obesity and overweight*. Geneva: World Health Organization, 2025.
- PADAYATTY, Sebastian J. et al. **Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention.** *Journal of the American College of Nutrition*, New York, v. 22, n. 1, p. 18–35, 2003.
- PALAMANDA, J. R.; KEHRER, J. P. **Involvement of vitamin C in iron-dependent lipid peroxidation.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 13, n. 5, p. 585–593, 1992.
- PAOLISSO, G. et al. **Plasma vitamin C affects glucose homeostasis in healthy subjects and in non-insulin-dependent diabetics.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 266, n. 2, p. E261–E268, 1994.
- PARK, Y. et al. **Vitamin C inhibits visceral adipocyte hypertrophy and lowers plasma glucose levels in high-fat-diet-induced obese mice.** *Biomedical Science Letters*, v. 24, n. 4, p. 311–318, 2018.
- PATEL, M. S.; SRINIVASAN, M. **Metabolic programming in the immediate postnatal life.** *Forum of Nutrition*, Basel, v. 63, p. 102–112, 2011.
- PATTISON, D. I.; HAWKINS, C. L.; DAVIES, M. J. **Hypochlorous acid-mediated protein oxidation: how important are chloramine transfer reactions and protein tertiary structure?** *Biochemistry*, v. 46, n. 34, p. 9853–9864, 2007.
- PESKIN, A. V.; MAGON, N. J.; BOZONET, S. M. **High-dose vitamin C blocks HOCl production by myeloperoxidase: a potential therapeutic strategy.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, art. 152213, 2025.
- PERRY, R. J. et al. **Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes.** *Cell*, v. 160, n. 4, p. 745–758, 2015.
- PETERSEN, M. C.; SHULMAN, G. I. **Mechanisms of insulin action and insulin resistance.** *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 98, n. 4, p. 2133–2223, 2018.
- PETERSEN, M. C.; VATNER, D. F.; SHULMAN, G. I. **Regulation of hepatic glucose metabolism in health and disease.** *Nature Reviews Endocrinology*, London, v. 13, n. 10, p. 572–587, 2017.
- PICARD, M.; HEPPLER, R. T.; BURELLE, Y. **Mitochondrial functional specialization in glycolytic and oxidative muscle fibers: tailoring the organelle for optimal**

- function.** *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 302, n. 4, p. C629-C641, 2012.
- PINHO, R. A. et al. **High-fat diet induces skeletal muscle oxidative stress in a fiber type-dependent manner in rats.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 110, p. 381–389, 2017.
- PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. **Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B.** *Chemico-Biological Interactions*, Amsterdam, v. 228, p. 88-99, 2015.
- PLAGEMANN, A. **Perinatal programming and functional teratogenesis: impact on body weight regulation and obesity.** *Physiology & Behavior*, v. 86, n. 5, p. 661-668, 2005.
- POWERS, S. K. et al. **Influence of exercise and fiber type on antioxidant enzyme activity in rat skeletal muscle.** *American Journal of Physiology*, Bethesda, v. 266, n. 2, pt. 2, p. R375-R380, 1994.
- PRZYBYŁO, M.; LANGNER, M. **On the physiological and cellular homeostasis of ascorbate.** *Cellular & Molecular Biology Letters*, v. 25, p. 32, 2020.
- QAISAR, R.; BHASKARAN, S.; PREMKUMAR, P. **Rethinking sarcopenia: a novel perspective on the role of skeletal muscle fiber type in aging.** *Aging*, Albany, v. 8, n. 2, p. 268–280, 2016. (a)
- QAISAR, R.; Bhaskaran, S.; Van Remmen, H. **Skeletal muscle fiber type diversification during exercise and regeneration.** *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 98, p. 56-67, 2016. (b)
- RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. **Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method.** *Nature Protocols*, London, v. 1, n. 6, p. 3159-3165, 2006. Published online 2007.
- RAMANUJAN, Suruchi et al. **Vitamin C: Is it Relevant or Obsolete in the Modern Era?** *Current Pediatrics Reports*, Cham, v. 12, p. 35–43, 2024.
- RE, R et al. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.
- RECKZIEGEL, M. B. et al. **The triglyceride-glucose index as an indicator of insulin resistance and cardiometabolic risk in Brazilian adolescents.** *Archives of Endocrinology and Metabolism*, v. 67, n. 2, p. 153–161, 2023.
- REID, D. T. et al. **Kupffer cells undergo fundamental changes during the development of experimental NASH and are critical in initiating liver damage and inflammation.** *PLOS ONE*, San Francisco, v. 11, n. 7, e0159524, 2016.
- RENSSEN, S. S. et al. **Increased hepatic myeloperoxidase activity in obese subjects with nonalcoholic steatohepatitis.** *The American Journal of Pathology*, v. 175, n. 4, p. 1473–1482, 2009.
- REZNICK, A Z.; PACKER, L. **Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay.** *Methods in Enzymology*, v. 233, p. 357–363, 1994.
- RICHTER, E. A.; BILAN, P. J.; KLIP, A. **A comprehensive view of muscle glucose uptake: regulation by insulin, contractile activity, and exercise.** *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 105, n. 3, p. 1867–1945, 2025.
- RICHTER, E. A.; HARGREAVES, M. **Exercise, GLUT4, and skeletal muscle glucose uptake.** *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 93, n. 3, p. 993–1017, 2013.
- RISTOW, M.; SCHMEISSER, K. **Mitohormesis: promoting health and lifespan by increased levels of reactive oxygen species (ROS).** *Dose-Response*, v. 12, n. 2, p. 288–341, 2014.

- RIZO-TÉLLEZ, S. A.; SEKHERI, M.; FILEP, J. G. **Myeloperoxidase: regulation of neutrophil function and target for therapy**. *Antioxidants*, Basel, v. 11, n. 11, p. 2302, 2022.
- ROSENFELD, C. S. **The developmental origins of health and disease (DOHaD): an evolutionary perspective**. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 138, p. 109-143, 2020.
- RUDRAPATNA, S. V. et al. **Skeletal muscle macrophages in obesity and insulin resistance: a systematic review**. *Obesity Reviews*, v. 20, n. 9, p. 1313–1331, 2019.
- RUI, L. **Energy metabolism in the liver**. *Comprehensive Physiology*, Hoboken, v. 4, n. 1, p. 177–197, 2014.
- SAE-KHOW, K et al. **High-dose intravenous ascorbate in sepsis, a pro-oxidant enhanced microbicidal activity and the effect on neutrophil functions**. *Biomedicines*, v. 11, n. 1, art. 51, 2023.
- SAKAMOTO, K. et al. **Overnutrition causes insulin resistance and metabolic disorder through increased sympathetic nervous system activity**. *Cell Metabolism*, v. 37, n. 1, p. 121–137.e6, 2025.
- SALTIEL, Alan R.; OLEFSKY, Jerrold M. **Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease**. *Journal of Clinical Investigation*, Ann Arbor, v. 127, n. 1, p. 1–4, 2017.
- SÁNCHEZ-GARCÍA, A. et al. **Diagnostic accuracy of the triglyceride and glucose index for insulin resistance: a systematic review**. *International Journal of Endocrinology*, v. 2020, art. 4678526, 2020.
- SANDOVAL, D. et al. **The sodium/ascorbic acid co-transporter SVCT2 distributes in a striated membrane-enriched domain at the M-band level in slow-twitch skeletal muscle fibers**. *Biological Research*, v. 57, art. 79, 2024.
- SARKHAIL, P. et al. **Antidiabetic effect of *Phlomis anisodonta*: effects on hepatic cells lipid peroxidation and antioxidant enzymes in experimental diabetes**. *Pharmacological Research*, v. 56, n. 3, p. 261–266, 2007.
- SAVINI, I. et al. **Redox regulation of vitamin C transporter SVCT2 in C2C12 myotubes**. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 361, n. 2, p. 385-390, 2007.
- SAWYER, S. M. et al. **The age of adolescence**. *The Lancet Child & Adolescent Health*, London, v. 2, n. 3, p. 223–228, 2018.
- SCHAUBROECK, K J.; LEITNER, B P.; PERRY, R J. **An optimized method for tissue glycogen quantification**. *Physiological Reports*, v. 10, e15195, 2022.
- SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. **Fiber types in mammalian skeletal muscles**. *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 91, n. 4, p. 1447–1531, 2011.
- SCHOLTES, C.; GIGUÈRE, V. **Transcriptional control of energy metabolism by nuclear receptors**. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 23, n. 11, p. 750–770, 2022.
- SCODITTI, E.; SABATINI, S.; CARLI, F. et al. **Hepatic glucose metabolism in the steatotic liver**. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, London, v. 21, n. 5, p. 319–334, 2024.
- SCODITTI, Egeria et al. **Obesity, adipose tissue dysfunction and metabolic diseases: current evidence and emerging therapeutic strategies**. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 25, n. 3, art. 1478, 2024.
- SENMARU, T. et al. **Pancreatic insulin release in vitamin C-deficient senescence marker protein-30/gluconolactonase knockout mice**. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 50, n. 2, p. 114–118, 2012.

- SHI, L.; RATH, M.; NIEDZWIECKI, A. **Dietary vitamin C and age-induced lipid and hormonal metabolic changes in a humanized mouse model not synthesizing vitamin C and producing lipoprotein(a) [Gulo (-/-); Lp(a)+].** *Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 2021, art. 5591697, p. 1-8, 2021.
- SHORTREED, Kate E. et al. **Different effects of a high-fat diet on insulin signaling in red and white skeletal muscle.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, Bethesda, v. 296, n. 3, p. E558-E566, 2009.
- SIES, H. **Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress.** *Redox Biology*, v. 11, p. 613–619, 2017.
- SIES, H. et al. **Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 25, p. 499-515, 2024.
- SIES, H.; MAILLOUX, R. J.; JAKOB, U. **Fundamentals of redox regulation in biology.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 25, p. 701–719, 2024.
- SILVESTRINI, A. et al. **Total antioxidant capacity: biochemical aspects and clinical significance.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, n. 13, art. 10978, 2023.
- SILVESTRINI, A.; MANCINI, A. **The double-edged sword of total antioxidant capacity: clinical significance and personal experience.** *Antioxidants*, v. 13, n. 8, art. 933, 2024.
- SOUTO PADRON DE FIGUEIREDO, A et al. **Nox2 mediates skeletal muscle insulin resistance induced by a high fat diet.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 290, n. 21, p. 13427–13439, 2015.
- STEFFNER, R. J.; WU, L.; POWERS, A. C.; MAY, J. M. **Ascorbic acid recycling by cultured beta cells: effects of increased glucose metabolism.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 10, p. 1612–1621, 2004.
- SYLOW, L. et al. **Rac1 signaling is required for insulin-stimulated glucose uptake and is dysregulated in insulin-resistant murine and human skeletal muscle.** *Diabetes*, v. 62, n. 6, p. 1865–1875, 2013.
- SYLOW, L. et al. **Rac1 is a novel regulator of contraction-stimulated glucose uptake in skeletal muscle.** *Diabetes*, v. 62, n. 4, p. 1139–1151, 2013.
- SYLOW, L. et al. **Rac1 governs exercise-stimulated glucose uptake in skeletal muscle through regulation of GLUT4 translocation in mice.** *The Journal of Physiology*, v. 594, n. 17, p. 4997–5008, 2016.
- SKOWRONSKI, A A et al. **Neurodevelopmental programming of adiposity: contributions to obesity risk.** *Endocrine Reviews*, Oxford, v. 45, n. 2, p. 253–280, 2024.
- SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; RODRÍGUEZ-MORÁN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. **The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects.** *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, New Rochelle, v. 6, n. 4, p. 299-304, 2008.
- SMITH, J. A. B. et al. **Exercise metabolism and adaptation in skeletal muscle.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, London, v. 24, n. 9, p. 607–632, 2023.
- SMITH, G. I. et al. **Insulin resistance drives hepatic *de novo* lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease.** *Journal of Clinical Investigation*, v. 130, n. 3, p. 1453–1460, 2020.

- SOUZA, L. L.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. **Litter size reduction as a model of overfeeding during lactation and its consequences for the development of metabolic diseases in the offspring.** *Nutrients*, Basel, v. 14, n. 10, art. 2045, 2022.
- SPEAR, L. P. **The adolescent brain and age-related behavioral manifestations.** *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Oxford, v. 24, n. 4, p. 417–463, 2000.
- STEFANIDIS, A.; SPENCER, S. J. **Effects of neonatal overfeeding on juvenile and adult feeding and energy expenditure in the rat.** *PLoS ONE*, v. 7, n. 12, e52130, 2012.
- SUN, Bo et al. **The role of GLUT2 in glucose metabolism in multiple organs and tissues.** *Molecular Biology Reports*, Dordrecht, v. 50, n. 8, p. 6963–6974, 2023.
- SYLOW, L. et al. **Exercise-stimulated glucose uptake — regulation and implications for glycaemic control.** *Nature Reviews Endocrinology*, London, v. 13, n. 3, p. 133–148, 2017.
- SZENDROEDI, J. et al. **Role of diacylglycerol activation of PKC θ in lipid-induced muscle insulin resistance in humans.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 111, n. 26, p. 9597–9602, 2014.
- TIGANIS, T. **Reactive oxygen species and insulin resistance: the good, the bad and the ugly.** *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 32, n. 2, p. 82–89, 2011.
- TITCHENELL, P. M.; LAZAR, M. A.; BIRNBAUM, M. J. **Unraveling the regulation of hepatic metabolism by insulin.** *Trends in Endocrinology & Metabolism*, v. 28, n. 7, p. 497–505, 2017.
- THORENS, B. **GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis.** *Diabetologia*, Berlin, v. 58, n. 2, p. 221–232, 2015.
- TOL, M. J. et al. **Dietary control of peripheral adipose storage capacity through membrane lipid remodelling.** *Nature Metabolism*, v. 7, n. 7, p. 1424–1442, 2025.
- TOSELLO-TRAMPONT, A.-C et al. **Kupffer cells trigger nonalcoholic steatohepatitis development in diet-induced mouse model through tumor necrosis factor-alpha production.** *Journal of Biological Chemistry*, Baltimore, v. 287, n. 48, p. 40161–40172, 2012.
- VAN DE GRAAF, S F. J. et al. **Getting in the zone: Metabolite transport across liver zones.** *Acta Physiologica*, Hoboken, v. 240, e 14239, 2024.
- VARGHESE, J. et al. **Development of insulin resistance preceded major changes in iron homeostasis in mice fed a high-fat diet.** *The Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 84, art. 108441, 2020.
- VARMA, V. et al. **Muscle inflammatory response and insulin resistance: synergistic interaction between macrophages and fatty acids leads to impaired insulin action.** *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, v. 296, n. 6, p. E1300–E1310, 2009.
- VICKERS, M. H. **Early life nutrition, epigenetics and programming of later life disease.** *Nutrients*, v. 6, n. 6, p. 2165–2178, 2014.
- VINER, R. M.; ALLEN, N. B.; PATTON, G. C. **Puberty, developmental processes, and health interventions.** In: BUNDY, D. A. P. et al. (ed.). *Child and Adolescent Health and Development*. 3. ed. Washington, DC: The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, 2017. cap. 9.
- Virtue, S.; Vidal-Puig, A. **Adipose tissue expandability, lipotoxicity and the metabolic syndrome—An allostatic perspective.** *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1801, n. 3, p. 338–349, 2010.
- VISSERS, M. C. M.; WILKIE, R. P. **Ascorbate deficiency results in impaired neutrophil apoptosis and clearance and is associated with up-regulation of**

- hypoxia-inducible factor 1 α** . *Journal of Leukocyte Biology*, v. 81, n. 5, p. 1236–1244, 2007.
- WANG, D. et al. **Ascorbic acid enhances low-density lipoprotein receptor expression by suppressing proprotein convertase subtilisin/kexin 9 expression**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 295, n. 47, p. 15870–15882, 2020.
- WANG, Z. et al. **Lysosome functions in atherosclerosis: a potential therapeutic target**. *Cells*, v. 14, n. 3, art. 183, 2025.
- WELLS, W. W. et al. **Ascorbic acid is essential for the release of insulin from scorbutic guinea pig pancreatic islets**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 92, n. 25, p. 11869–11873, 1995.
- WILSON, R B et al. **Molecular pharmacology of vitamin C and relevance to health and obesity: a narrative review**. *International Journal of Molecular Sciences*, Basel, v. 25, n. 14, p. 7523, 2024.
- WINKLER, B. S.; ORSELLI, S. M.; REX, T. S. **The redox couple between glutathione and ascorbic acid: a chemical and physiological perspective**. *Free Radical Biology and Medicine*, Oxford, v. 17, n. 4, p. 333–349, 1994.
- WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J.; HAMPTON, M. B. **Reactive oxygen species and neutrophil function**. *Annual Review of Biochemistry*, v. 85, p. 765–792, 2016.
- WUNDERLICH, A. L. M. et al. **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 Research Bulletin*, v. 195, p. 109–119, 2023.
- XIA, W. et al. **Loss of ABHD15 impairs the anti-lipolytic action of insulin by altering PDE3B stability and contributes to insulin resistance**. *Cell Reports*, v. 23, n. 7, p. 1948–1961, 2018.
- XOURAFA, G.; KORBMACHER, M.; RODEN, M. **Inter-organ crosstalk during development and progression of type 2 diabetes mellitus**. *Nature Reviews Endocrinology*, London, v. 20, n. 1, p. 27–49, 2024.
- YAGIL R, Etzion Z, Berlyne GM. **Changes in rat milk quantity and quality due to variations in litter size and high ambient temperature**. *Lab Anim Sci*, 1976.
- YU, J. et al. **Redox Biology in Adipose Tissue Physiology and Obesity**. *Advanced Biology*, Weinheim, v. 7, e2200234, 2023.
- ZENG, Q. et al. **Prophylactic and therapeutic effects of different doses of vitamin C on high-fat-diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice**. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, Paris, v. 131, art. 110792, 2020.
- ZHAO, L. et al. **Inhibiting myeloperoxidase prevents onset and reverses established high-fat diet-induced microvascular insulin resistance**. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2020.
- ZSOMBOK, A.; DESMOULINS, L. D.; DERBENEV, A. V. **Sympathetic circuits regulating hepatic glucose metabolism: where we stand**. *Physiological Reviews*, Bethesda, v. 104, n. 1, p. 85–101, 2024.



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 87/2020

Londrina, 24 de julho de 2020.

Prezado (a) professor (a),

Certificamos que o projeto intitulado: "**Efeitos da vitamina C nos parâmetros metabólicos, vasculares e reprodutivos de ratos com obesidade induzida por supernutrição neonatal por redução de ninhada**" protocolo CEUA nº 024.2020 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) no dia **21/07/2020**.

Este projeto tem por objetivos avaliar os efeitos da Vitamina C na homeostase energética e sistemas reprodutor e vascular de ratos machos obesos devido à manipulação neonatal, com redução do tamanho da ninhada, na infância (21 dias) e na vida adulta (60 dias). **Grau de invasividade: 3.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/09/2020 a 31/08/2023
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogêneo/ Wistar
Nº de animais	5040 , sendo: Matrizes: 420 machos e 420 fêmeas (840 animais); Prole estimada: 2100 machos e 2100 fêmeas (4200 animais).
Peso/ Idade	Adultos de 90 dias e prole
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Tecido adiposo, fígado, músculos gastrocnêmio e sóleo, hipotálamo, sangue, aorta, testículos, epidídimos, ductos deferentes.

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
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

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