



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

POLYANA KEIKO SHISHIDO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E  
REPRODUTIVOS NAS PROLES DE RATOS SUBMETIDOS À  
SUPERNUTRIÇÃO PÓS-NATAL POR REDUÇÃO DO  
TAMANHO DA NINHADA**

---

Londrina  
2024

POLYANA KEIKO SHISHIDO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E  
REPRODUTIVOS NAS PROLES DE RATOS SUBMETIDOS À  
SUPERNUTRIÇÃO PÓS-NATAL POR REDUÇÃO DO  
TAMANHO DA NINHADA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa

Londrina  
2024

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

Shishido, Polyana Keiko.

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E REPRODUTIVOS NAS PROLES DE RATOS SUBMETIDOS À SUPERNUTRIÇÃO PÓS-NATAL POR REDUÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA / Polyana Keiko Shishido. - Londrina, 2024.  
63 f.

Orientador: Ernane Torres Uchôa.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2024.  
Inclui bibliografia.

1. metabolismo, reprodução, supernutrição pós-natal - Tese. I. Uchôa, Ernane Torres. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

POLYANA KEIKO SHISHIDO

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS METABÓLICOS E  
REPRODUTIVOS NAS PROLES DE RATOS SUBMETIDOS À  
SUPERNUTRIÇÃO PÓS-NATAL POR REDUÇÃO DO  
TAMANHO DA NINHADA**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Priscila Cassolla  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Cristiane Mota Leite  
Universidade Norte do Paraná - UNOPAR

Londrina, 28 de fevereiro de 2024.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, obrigada à Deus e à minha família.

Ao Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa, meu orientador, pela competência, paciência, experiência, excelência, conselhos e exemplo de dedicação durante toda a caminhada. É uma honra poder contar com o senhor.

Aos professores Andressa de Freitas Mendes Dionísio, Cássia Thaís Bussamra Vieira Zaia Cláudia Bueno dos Reis Martinez, Daniela Cristina Ceccato Gerardin (*in memoriam*), Estefânia Gastaldello Moreira, Fábio Goulart de Andrade, Gisele Lopes Bertolini, Gislaine Garcia Pelosi Gomes, Glaura Scantamburlo Alves Fernandes, Graziela Scaliante Ceravolo, Juliana Delatim Simonato Rocha, Marcos Polito, Maria Fernanda Rodrigues Graciano, Marli Cardoso Martins Pinge, Paulo Cesar Meletti e Priscila Cassolla que contribuíram para a conclusão dessa etapa por terem me recebido e compartilhado ensinamentos com maestria.

Aos amigos do laboratório, Larissa Rugila dos Santos Stopa, Rhauany Pelisson Guergolette, Ana Luiza Machado Wunderlich, Danielly Duarte Aguiar, Deborah Hikari Morimoto Ota, Camila Francielli de Souza, Fabiano Takeo Komay Tsutsui, Lucas Leonardo França de Oiveira, Ana Carolina Valverde da Silva, Isabella Maria Tomaz Bissochi, Maria Clara Alves Schroeder, Yhassodara Narimatsu Oliveira, Mariana Weinhardt Nieddermeyer, Raul Henrique Tonin dos Santos, Ayna Isabelle Lino, Emanuelle Passos Cerqueira e Lucas Valente pelo companheirismo, pelos ensinamentos, por tirarem inúmeras dúvidas durante os experimentos e por tornarem meus dias mais leves.

Aos técnicos Fujiko Eliana Morinaga, Afonso de Azevedo Saiz e Wagner Ezequiel Risso e a secretária do Programa de Pós-Graduação Thialla Fernandes, pelo sorriso no rosto, pela atenção, cuidado e dedicação.

À Universidade Estadual de Londrina (UEL) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e ao Governo do Estado do Paraná, Conselho Paranaense de Ciência e Tecnologia, e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia, e Ensino Superior (SETI) (dotação orçamentária # 4560.19.571.06.6153; e protocolo 21.234.745-0) e Fomento ao Biotério.

## RESUMO

SHISHIDO, Polyana Keiko. **Avaliação de parâmetros metabólicos e reprodutivos nas proles de ratos submetidos à supernutrição pós-natal por redução do tamanho da ninhada.** 63 folhas. Trabalho de Dissertação do Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024.

O período pré-natal, a infância e a adolescência são períodos críticos do desenvolvimento caracterizados pela alta plasticidade. As Origens Paternas da Saúde e da Doença (POHaD), uma extensão do paradigma das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD), tem demonstrado em estudos em ratos que a obesidade paterna é associada não somente a incidência de infertilidade, mas também com o risco do aumento de distúrbios metabólicos nas proles na vida adulta. Em roedores, a redução de ninhada é um dos modelos experimentais para induzir a supernutrição lactacional, aumentando a quantidade de leite dada aos filhotes, o que pode causar disfunções metabólicas e reprodutivas na vida adulta. Esse trabalho visou avaliar as possíveis alterações reprodutivas e metabólicas na prole de machos submetidos à supernutrição pós-natal induzida pela redução de ninhada, no período pré-pubere e na vida adulta. Os resultados demonstraram que a superalimentação precoce do pai afeta a prole de maneira sexo específica. No período pré-púbere, a prole de machos de pais de ninhada reduzida demonstrou redução do Índice de Lee, do tamanho da tíbia e da concentração de HDL no plasma, apesar do aumento da ingestão alimentar e do peso do músculo gastrocnêmico, enquanto as fêmeas apresentaram redução do HDL no plasma e aumento da concentração de glicose. Na vida adulta, a prole de machos de pais de ninhada reduzida apresentou intolerância à glicose, redução na ingestão alimentar, na concentração de triglicérides no plasma e no Índice TyG, sinais de disfunção metabólica, enquanto as fêmeas demonstraram atraso na instalação da puberdade, maior prevalência de períodos não férteis no ciclo estral, e maior concentração de estradiol, indicando uma potencial suscetibilidade à disfunção reprodutiva. Os resultados desse estudo demonstram que a superalimentação precoce do pai afeta o equilíbrio energético e a reprodução de seus descendentes de maneira sexo específica.

**Palavras-chave:** superalimentação pós-natal; PoHaD; metabolismo; reprodução

## ABSTRACT

Shishido, Polyana Keiko. **Assessment of Metabolic and Reproductive Parameters in the Offspring of Rats Experiencing Postnatal Supernutrition through Limited Size Reduction**. 2024. 63 folhas. Trabalho de Dissertação de Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – Centro de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2024

The prenatal period, childhood, and adolescence are critical periods of development characterized by high plasticity. As an extension of the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) paradigm, known as Origins of Paternal Health and Disease (POHaD), recent studies in rodents provide evidence that paternal obesity is associated not only with the incidence of infertility but also with an increased risk of metabolic disorders in the offspring in adulthood. In rodents, litter size reduction is one of the experimental models used to induce lactational overfeeding by increasing the amount of breast milk given to pups, which causes metabolic and reproductive disorders in adulthood. Thus, this work aimed to evaluate the possible metabolic and reproductive alterations in the offspring of males subjected to postnatal overfeeding induced by litter size reduction, in the prepubertal period and adult life. The results of the current study show that paternal obesity due to early overfeeding affects the offspring in a sex-specific manner. During the prepubertal period, male offspring of small litter fathers showed decreased Lee index, tibia length and HDL plasma levels, despite the increased food intake and weight of gastrocnemius muscle, while female offspring of small litter fathers showed reduced HDL plasma levels and higher glucose plasma levels. In adulthood, male offspring of overfed males showed glucose intolerance, reduced food intake, triglycerides plasma levels and TyG index, which are signs of metabolic dysfunction, while female offspring of overfed showed delayed puberty onset, higher prevalence of infertile periods in the estrous cycles and higher estradiol plasma levels, indicating a potential susceptibility to reproductive dysfunctions. The results of the current study show that paternal obesity due to early overfeeding affects the energy balance and reproduction of their offspring in a sex-specific manner.

**Key-words:** postnatal overfeeding; PoHaD; offspring; metabolism; reproduction

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Perfil hormonal da secreção de LH, FSH, prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral. Fotomicrografias do epitélio referente a cada fase do ciclo estral..... 16
- Figura 2** – Protocolo obtenção de pai de ninhada normal e de pai de ninhada reduzida ..... 21
- Figura 3** – Protocolo 1 ..... 23
- Figura 4** – Protocolo 2 ..... 24
- Figura 5** – Curva de peso corporal (g) do DPN 4-30 de proles femininas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR) ..... 28
- Figura 6** – Ingestão alimentar (g/100g de peso corporal) de DPN 25-30 (a), índice de Lee (g/1/3) (b), distância naso-anal (cm) (c) e comprimento da tíbia (cm) (d) proles femininas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR) ..... 29
- Figura 7** – Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles femininas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR) ..... 31
- Figura 8** – Glicemia durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a) e área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicemia (mg/dL) e Índice TyG de fêmeas descendentes pré-púberes de PNN (Pai de Ninhada Normal) e PNR (pai de ninhada reduzida) .... 32
- Figura 9** – Curva de peso corporal (g) do DPN 4-30 de proles masculina de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). ..... 33
- Figura 10** – Ingestão alimentar (g/100g de peso corporal) de DPN 25-30 (a),

índice de Lee ( $g^{1/3}$ ) (b), distância naso-anal (cm) (c) e comprimento da tíbia (cm) (d) de proles masculinas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR) .....	34
<b>Figura 11</b> – Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles masculinas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). .....	35
<b>Figura 12</b> – Glicemia durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a) e área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicemia (mg/dL) e Índice TyG de proles masculinas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	36
<b>Figura 13</b> – Peso corporal (g) DPN 30-90 (a) e Ingestão alimentar (g/100 g) DPN 30-90 (b) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	37
<b>Figura 14</b> – Índice de Lee ( $g^{1/3}$ ) (a), distância naso-anal (cm) (b) e comprimento da tíbia (cm) (c) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	39
<b>Figura 15</b> – Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	40
<b>Figura 16</b> – durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a) e área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicose (mg/dL) e Índice TyG de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	41
<b>Figura 17</b> – Abertura vaginal (DPN) (a), primeiro estro (DPN) (b), regulação do ciclo (DPN) (c), e duração do ciclo (dias) (d) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR) .....	43

<b>Figura 18</b> – Coeficiente de diestro I e II (%) (a), coeficiente de proestro (%) (b), coeficiente de estro (%) (c), e estradiol plasmático (ng/mL) (d) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	44
<b>Figura 19</b> – Peso corporal (g) DPN 30-90 (a), Ingestão alimentar (g/100 g) DPN 30-90 (b) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	45
<b>Figura 20</b> – Índice de Lee (g <sup>1/3</sup> ) (a), distância naso-anal (cm) (b) e comprimento da tíbia (cm) (c) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	46
<b>Figura 21</b> – Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	47
<b>Figura 22</b> – Glicemia durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a), área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicose (mg/dL) (c) e Índice TyG (d) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR) .....	48
<b>Figura 23</b> – Descolamento do prepúcio (dias) (a) e testosterona (ng/mL) (b) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEUA	Comissão para o Uso de Animais Experimentais
DOHaD	<i>Developmental Origins of Health and Disease</i>
DPN	Dia pós-natal
FIG	Figura
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	<i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
GTT	Teste de tolerância à glicose
HDL	<i>High density lipoproteins</i>
IMC	Índice de Massa Corpórea
LH	Hormônio luteinizante
PNN	Prole de ninhada normal
PNR	Prole de ninhada reduzida
POHaD	<i>Paternal Origins of Health and Disease</i>
TyG	<i>Triglycerides/glucose</i>
UEL	Universidade Estadual de Londrina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	20
<b>4.</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	21
4.1	ANIMAIS .....	21
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 – EFEITOS DA OBESIDADE PATERNA INDUZIDA PELA SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL NOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, METABÓLICOS E REPRODUTIVOS NA PROLE NA PRÉ-PUBERDADE.....	22
4.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 – EFEITOS DA OBESIDADE PATERNA INDUZIDA PELA SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL NOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, METABÓLICOS E REPRODUTIVOS NA PROLE NA VIDA ADULTA.....	23
4.4	ÍNDICE DE LEE .....	24
4.5	MEDIÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL TOTAL, TRIGLICÉRIDES, PROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE (HDL), GLICOSE, ESTRADIOL E TESTOSTERONA.....	25
4.6	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE .....	25
4.7	ÍNDICE DE TRIGLICÉRIDES E GLICOSE .....	25
4.8	INSTALAÇÃO DA PUBERDADE: ABERTURA VAGINAL, PRIMEIRO ESTRO, REGULAÇÃO DA CICLICIDADE ESTRAL E SEPARAÇÃO DO PREPÚCIO.....	26
4.9	DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL .....	26
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	27
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	28
5.1	PRÉ-PÚBERES .....	28
5.1.1	Fêmeas .....	28
5.1.1.1	Parâmetros biométricos .....	28
5.1.1.2	Parâmetros lipídicos.....	31
5.1.1.3	Parâmetros glicêmicos .....	32
5.1.2	Machos.....	33

5.1.2.1	Parâmetros biométricos .....	33
5.1.2.2	Parâmetros lipídicos .....	34
5.1.2.3	Parâmetros glicêmicos .....	35
5.2	ADULTOS .....	37
5.2.1	Fêmeas .....	37
5.2.1.1	Parâmetros biométricos .....	37
5.2.1.2	Parâmetros lipídicos .....	39
5.2.1.3	Parâmetros glicêmicos .....	40
5.2.1.4	Parâmetros reprodutivos .....	42
5.2.2	Machos .....	45
5.2.2.1	Parâmetros biométricos .....	45
5.2.2.2	Parâmetros lipídicos .....	47
5.2.2.3	Parâmetros glicêmicos .....	48
5.2.2.4	Parâmetros reprodutivos .....	50
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>62</b>
	ANEXO A .....	63

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é definida como um acúmulo anormal de tecido adiposo, que apresenta risco para a saúde causada, principalmente, por um desbalanço energético de longo prazo entre as calorias consumidas e as calorias gastas (Organização Mundial da Saúde), com etiologia multifatorial e sustentada por interações complexas de fatores genéticos, ambientais e psicossociais (Zheng et. al, 2017).

Em 2020, 38% da população mundial apresentava níveis de sobrepeso ou obesidade (IMC  $\geq 25\text{kg/m}^2$ ), e a estimativa para o ano de 2035 é de que essa porcentagem aumente para 50%, ou seja, mais de 4 bilhões de pessoas (excluindo-se crianças com menos de 05 anos). Estima-se um aumento da prevalência da obesidade na infância e adolescência de 10% para 20% em meninos e de 8% para 18% em meninas entre 2020 e 2035 (World Obesity Atlas, 2023).

O período pré-natal, a infância e a adolescência são períodos críticos do desenvolvimento caracterizados pela alta plasticidade. Assim, um insulto ou um estímulo significativo nessa fase, podem gerar efeitos de ordem organizacional no funcionamento do organismo. De acordo com o modelo das respostas adaptativas preditivas, o organismo em desenvolvimento tem a capacidade de prever o ambiente em que irá se desenvolver, utilizando-se dos sinais maternos através da placenta e/ou através da lactação que, por sua vez, promove ajustes fisiológicos no indivíduo baseados nessas inferências (Silveira et. al, 2007).

Porém, se os sinais ambientais não condizerem com o ambiente futuro do indivíduo, essas modificações podem ter efeitos adversos, sobretudo quando as condições de exposição na concepção e pré-natal se mostraram incorretas (Day et. al, 2016). O risco para doenças então seria o resultado entre o ambiente previsto pelo indivíduo durante o período de grande plasticidade e desenvolvimento e o ambiente real na maturidade (Silveira et. al, 2007). Isso ocorre porque a má-programação das vias regulatórias pode afetar de forma permanente o controle da homeostase energética e a dinâmica de crescimento como resposta a uma experiência inapropriada imediatamente a vida pós-natal (Habbout et. al 2013).

Assim, sugere-se que a infância é um período crítico para o desenvolvimento da obesidade e seus resultados relacionados à saúde (Zheng et. al, 2017), podendo influenciar no peso corporal e na homeostase energética na vida adulta (Habbout et. al, 2013), por meio de efeitos epigenéticos que podem persistir, inclusive, de forma

transgeracional (Silveira et. al, 2007).

Nesse sentido, há evidências epidemiológicas consistentes que relacionam os eventos adversos da infância com o aumento do risco de desenvolvimento de síndrome metabólica, caracterizada pela obesidade, pressão alta, altas concentrações plasmáticas de triglicerídeos, baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL- *High density lipoproteins*) e tolerância à glicose prejudicada ou resistência à insulina, além de outras comorbidades relacionadas na vida adulta (Luo, Xiao, Nuyt , 2010).

Em se tratando dos períodos de desenvolvimento de ratos, o período pré-natal ocorre durante o período gestacional de 21 dias. Após o nascimento, os recém-nascidos ficam aos cuidados maternos que duram de 14 a 21 dias. Esse período de desenvolvimento é conhecido como neonatal ou fase pré-desmame. O desmame geralmente acontece por volta do 21º dia e é quando o animal entra no estágio pré-púbere ou pós-desmame (Eiland & Romeo, 2014, Sharp & Villano, 2012).

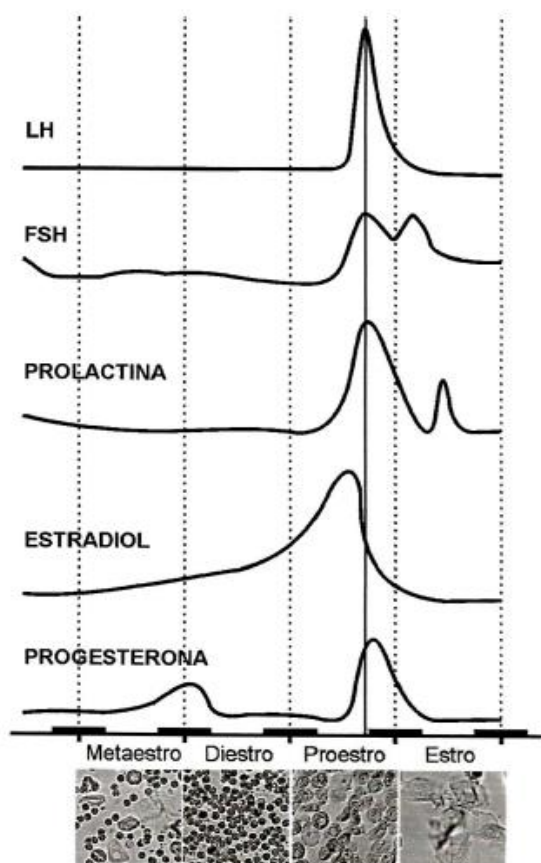
Nesse ponto, insta salientar que embora os termos puberdade e adolescência sejam usados como equivalentes, esses termos não são sinônimos. A puberdade é um período marcado por mudanças hormonais e somáticas significativas, geralmente ocorre antes em fêmeas do que em machos (Eiland & Romeo, 2014). Em ratos, pode ocorrer entre o 25º e o 34º dia pós nascimento, de acordo com Sharp & Villano (2012), e entre o 30º e 35º dia, de acordo com Eiland & Romeo (2014). A adolescência, por sua vez, é o estágio de desenvolvimento que começa com o início da puberdade e termina com a obtenção de maturidade sexual e características neurocomportamentais associadas aos adultos.

Na infância, as células somáticas das gônadas, que são responsáveis pela gametogênese, não são capazes de responder totalmente à estimulação de gonadotrofinas e, nessa fase, a liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (*gonadotropin-releasing hormone* – GnRH) está suprimida. Por esse motivo, as gônadas permanecem em um estado fisiológico de baixa atividade até o início do desenvolvimento puberal (Plant, 2015).

Após a infância, o período pré-púbere é marcado pela maturação da maioria dos circuitos neuroendócrinos, incluindo os que envolvem o gasto de energia, seguido pela puberdade que é marcada pelo aumento de hormônios esteroides, o qual é acompanhado por alterações metabólicas, de modo que a alimentação nesse período tem efeitos mais deletérios na vida adulta dos ratos quando submetidos a uma dieta

hiperlipídica (Barella et. al, 2012). Com o início da puberdade, ocorrem mecanismos neurais complexos que dependem da liberação pulsátil de GnRH (Livadas & Chouros, 2016), que são liberados pelos respectivos neurônios na eminência mediana e age em células da hipófise conhecidas como gonadotrofos, onde por sua vez, controla a liberação pulsátil das gonadotrofinas, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), que regulam as funções gametogênicas e esteroidogênicas gonadais, estimulando a produção de estradiol, progesterona e testosterona (Herbison, 2016).

Nesse contexto, normalmente, as ratas começam a ciclar imediatamente após a abertura vaginal e cada ciclo estral costuma durar de 4 a 5 dias (Goldman, Murr e Cooper, 2007). Cada uma das fases do ciclo estral é determinada pelos tipos de células que descamam do epitélio vaginal, um tecido demasiadamente responsivo ao estradiol e à progesterona (Fig. 1).



**Fig. 1** – Perfil hormonal da secreção de LH, FSH, prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral. Na parte inferior, fotomicrografias do epitélio referente a cada fase do ciclo estral (Anselmo-Franci, Szawka. Controle Neuroendócrino da Reprodução Feminina. In: Antunes-Rodrigues J; Cols. (Org.). Neuroendocrinologia Básica e Aplicada. Rio de Janeiro. 2005.p. 321-322)

Pesquisas nos campos epidemiológico, clínico, e das ciências básicas têm identificado o período próximo à concepção como sendo crucial para os processos que medeiam a saúde das próximas gerações. No período, desde a maturação dos gametas até o desenvolvimento inicial do embrião, o estilo de vida dos pais pode influenciar de forma adversa os riscos a longo prazo de morbidades cardiovasculares, imunes, metabólicas e neurológicas na prole, geralmente conhecidas como programação de desenvolvimento (Fleming et. al, 2018).

De fato, nas últimas décadas, originalmente com foco na saúde materna, os estudos das origens desenvolvimentistas da saúde e doença (DOHaD) combinam pesquisas experimentais, clínicas, epidemiológicas e de saúde pública, com objetivo de entender como eventos no início da vida repercutem no risco de morbidade na vida adulta e próximas gerações (Gluckman et. al, 2010).

Ademais, pesquisas também têm identificado a conexão entre a saúde paterna e a qualidade do esperma ao desenvolvimento do embrião e, à saúde da prole (Batra et. al., 2022) apesar de os pais, ao contrário das mães, possuírem apenas uma pequena janela para transmitir sua programação metabólica, qual seja, a concepção (Comas-Armangue et. al, 2022). Essa vertente é uma extensão do paradigma do DOHaD e é conhecida como Origens da Saúde e da Doença Paternas (POHaD) (Soubry, 2018).

Nesse aspecto, estudos realizados em roedores demonstram evidências de que a obesidade paterna está associada não somente à incidência de infertilidade (Raad G, et. al, 2019), mas também ao aumento do risco de distúrbios metabólicos de sua prole na vida adulta (Billah et. al, 2022).

Um modelo de programação neonatal de indução da obesidade em roedores é a supernutrição pós-natal por redução do tamanho da ninhada. Neste método, os animais são alocados em ninhadas menores do que o habitual, como por exemplo, em 3 ou 4 filhotes em comparação com o controle, com 10 a 12 filhotes (Souza, Moura & Lisboa, 2022). Com isso, ocorre a diminuição da competição pelo leite durante a amamentação e maior ingestão de calorias, sendo que alguns estudos observaram que o leite era rico em lipídeos, especialmente, triglicerídeos (Habbout et. al, 2013).

A partir do desmame, esses animais são mantidos em uma dieta alimentar padrão controlada, o que demonstra que a superalimentação no período pós-natal por si só é capaz de aumentar o risco de doenças crônicas de início tardio (Pentinat et. al,

2010).

Os roedores amamentados em ninhadas reduzidas geralmente desenvolvem obesidade e doenças metabólicas relacionadas à obesidade na vida adulta, como por exemplo, resistência à insulina, intolerância à glicose e alteração de maturação sexual, além de estender os efeitos para as próximas gerações de forma intergeracional ou transgeracional dos efeitos da programação do desenvolvimento (Souza, Moura & Lisboa, 2022, Parra-Vargas, et. al, 2023).

Nesse contexto, foi demonstrado que as proles de mães com obesidade por supernutrição lactacional apresentam alterações metabólicas, cardíacas e na secreção dos hormônios sexuais (Ferreira et al., 2022). No entanto, não há dados na literatura, ao que se sabe, a respeito dos efeitos supernutrição lactacional paterna nas repercussões metabólicas e reprodutivas em suas proles.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando que: 1) a supernutrição lactacional por redução do tamanho da ninhada leva à obesidade, 2) estudos em roedores demonstram que a obesidade paterna está associada, não somente à incidência de infertilidade, mas também ao aumento do risco de distúrbios metabólicos de sua prole na vida adulta, 3) e há uma escassez da literatura das repercussões metabólicas e reprodutivas na prole de pais com obesidade por supernutrição lactacional, faz-se relevante o estudo dos efeitos da obesidade paterna induzida por superalimentação pós-natal por redução de ninhada na fase pré-púbere, um período caracterizado pela alta plasticidade, e na vida adulta de suas proles masculinas e femininas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os seguintes parâmetros metabólicos e reprodutivos nas proles feminina e masculina de machos submetidos à superalimentação pós-natal induzida por redução do tamanho da ninhada.

- Parâmetros biométricos: ganho de peso corporal, ingestão alimentar, peso de tecido adiposo branco visceral, ovários, útero e adrenais, músculos sóleo e gastrocnêmico, comprimento da tíbia, Índice de Lee e distância naso-anal;
- Parâmetros reprodutivos nas fêmeas: abertura vaginal, primeiro estro e ciclicidade e, no primeiro proestro após o DPN 90 concentração de estradiol, LH, FSH;
- Parâmetros reprodutivos nos machos: descolamento do prepúcio e, no DPN 90 concentração de testosterona, LH, FSH;
- Perfil glicêmico pelo teste de tolerância à glicose (GTT) e índice TyG (produto da concentração sérica de triglicerídeos e glicemia de jejum);
- Perfil lipídico: concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total e lipoproteína de alta densidade (HDL).

## 4. MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Machos e fêmeas foram obtidos no Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Após o período de adaptação de cinco dias, foi realizado o lavado vaginal diariamente nas fêmeas por volta das 10h. Sendo constatado o proestro, ao final do dia a fêmea foi colocada com um macho para acasalamento. Na manhã seguinte, quando se observava a presença de espermatozoides no lavado vaginal, considerava-se que a rata estava prenha, ou, dia gestacional 0. A partir desse momento, cada fêmea foi alocada em caixas individuais até o desmame dos filhotes.

O dia do nascimento foi considerado o DPN 0, neste dia o tamanho da ninhada foi ajustado para 03 (três) filhotes nas ninhadas reduzidas (uma fêmea e dois machos) e para 10 filhotes (cinco machos e cinco fêmeas) na ninhada normal (Wunderlich et al., 2023) (Fig.2).

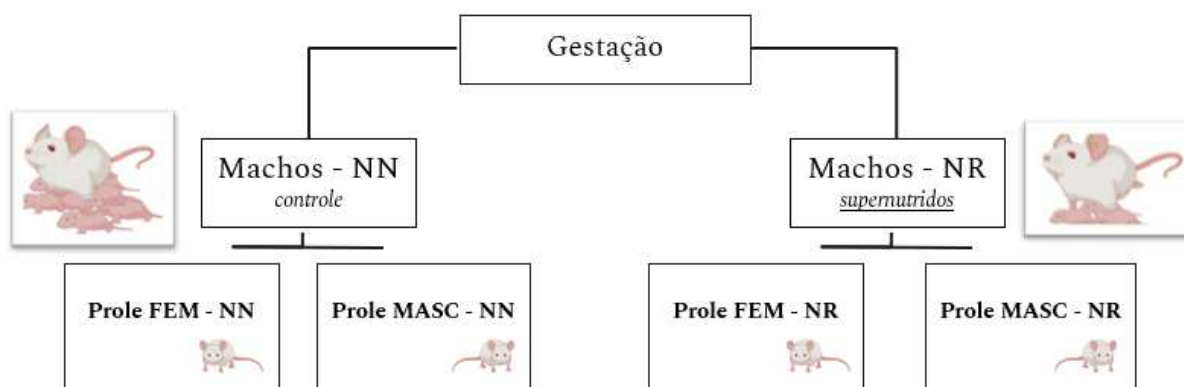


Fig. 2. Obtenção de animais do grupo controle e de ninhada reduzida.

No dia pós-natal 90, os machos obtidos das ninhadas normais e das ninhadas reduzidas, foram colocados para acasalar com fêmeas oriundas do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL) para obter a segunda geração de filhotes, machos e fêmeas. Após o nascimento, no dia pós-natal 04, a ninhada foi ajustada para oito filhotes (quatro machos e quatro fêmeas). No DPN 21, após o desmame, os animais foram divididos em dois grupos: descendentes de pai de ninhada normal e descendentes de pai de ninhada reduzida, sendo formados quatro

grupos no total: fêmeas descendentes do grupo controle, machos descendentes de pai do grupo controle, fêmeas descendentes de pai de ninhada reduzida, machos descendentes de pai de ninhada reduzida. Cada caixa continha quatro machos e quatro fêmeas separados de acordo com o sexo e grupo.

Quando necessário, filhotes nascidos no mesmo dia foram aleatoriamente retirados de uma matriz e colocados com outra, de acordo com o grupo, para garantir a proporção correta no número de machos e fêmeas (Wunderlich et al., 2023). Os animais excedentes que não foram incluídos nessas adoções foram eutanasiados por decapitação.

Todos os animais foram alocados no biotério do Departamento Ciências Fisiológicas, mantidos em condições controladas de luz (ciclos de 12 horas claro/escuro) e temperatura ( $22 \pm 2$  °C), com acesso livre a água e comida, exceto nos experimentos envolvendo privação alimentar, conforme será detalhado adiante. Todos os procedimentos experimentais foram conduzidos no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo do Programa de Ciências Fisiológicas, começando as 14h.

A ética na condução desse protocolo foi devidamente reconhecida e aprovada pelo Comissão para o Uso de Animais Experimentais (CEUA nº 18310.2019.03, Ofício Circular CEUA nº 164/2019).

#### 4.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL 1 – EFEITOS DA OBESIDADE PATERNA INDUZIDA PELA SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL NOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, METABÓLICOS E REPRODUTIVOS NAS PROLES NA PRÉ-PUBERDADE.

Após o desmame, o peso corporal e a ingesta alimentar de ratos pré-púberes descendentes de ninhada normal e reduzida, fêmeas e machos, foram monitorados a partir do DPN 25 e DPN 30, respectivamente. No DPN 29 para as fêmeas e DPN 31 para os machos, a alimentação foi removida dos animais às 08h e às 14h foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT). No DPN 30 para as fêmeas e DPN 32 para os machos, a alimentação foi removida às 08h, quando os animais foram pesados e foi aferida a distância naso-anal. Às 14h, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação e foram colhidos sangue para análises bioquímicas com plasma e os seguintes órgãos foram removidos e pesados: testículos esquerdo e direito (machos);

glândula adrenal direita e esquerda; tecido adiposo retroperitoneal; tecido adiposo perigonadal; ovário esquerdo e direito (fêmeas); útero, músculos sóleo e gastrocnêmico da pata esquerda, assim como a tibia esquerda foi removida e mensurada o comprimento.

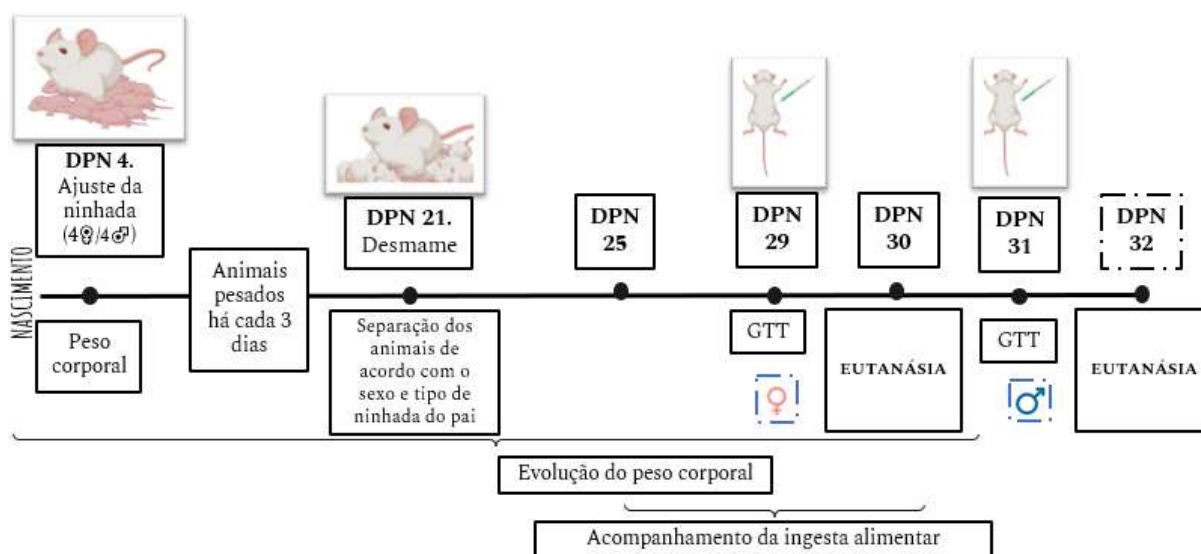


Fig. 3. Protocolo experimental 01

#### 4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 2 – EFEITOS DA OBESIDADE PATERNA INDUZIDA PELA SUPERNUTRIÇÃO NEONATAL NOS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS, METABÓLICOS E REPRODUTIVOS NA PROLE NA VIDA ADULTA

No segundo protocolo, o peso corporal e a ingestão alimentar (Equações 1 e 2) foram monitoradas a cada cinco dias do dia pós-natal 25 até o dia pós-natal 90. No DPN 89, a alimentação foi removida dos animais às 08h e às 14h foi realizado o teste de tolerância à glicose (GTT). No dia pós-natal 90, para os descendentes machos, e no primeiro pró-estro após o DPN 90 para as descendentes fêmeas, houve a remoção da alimentação as 08h, ocasião em que os animais foram pesados e medidos (comprimento naso-anal), e após seis horas de restrição alimentar, às 14h foi realizada a eutanásia por decapitação, sendo coletados sangue para análises bioquímicas, além de serem coletados os testículos esquerdo e direito (machos), tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, ovário esquerdo e direito (fêmeas), útero (fêmeas),

músculos sóleo e gastrocnêmico e tibia da pata traseira esquerda dos animais, bem como a glândula adrenal direita e esquerda.

Equação 1 –

INGESTÃO ALIMENTAR MÉDIA (IAM) = (Ração disponibilizada (g) - Ração após 5 dias) / Número de animais na caixa x 5 dias;

Equação 2

INGESTÃO NORMALIZADA POR g/100g (rato) = 100 x IAM / Peso corporal do animal (última pesagem)]

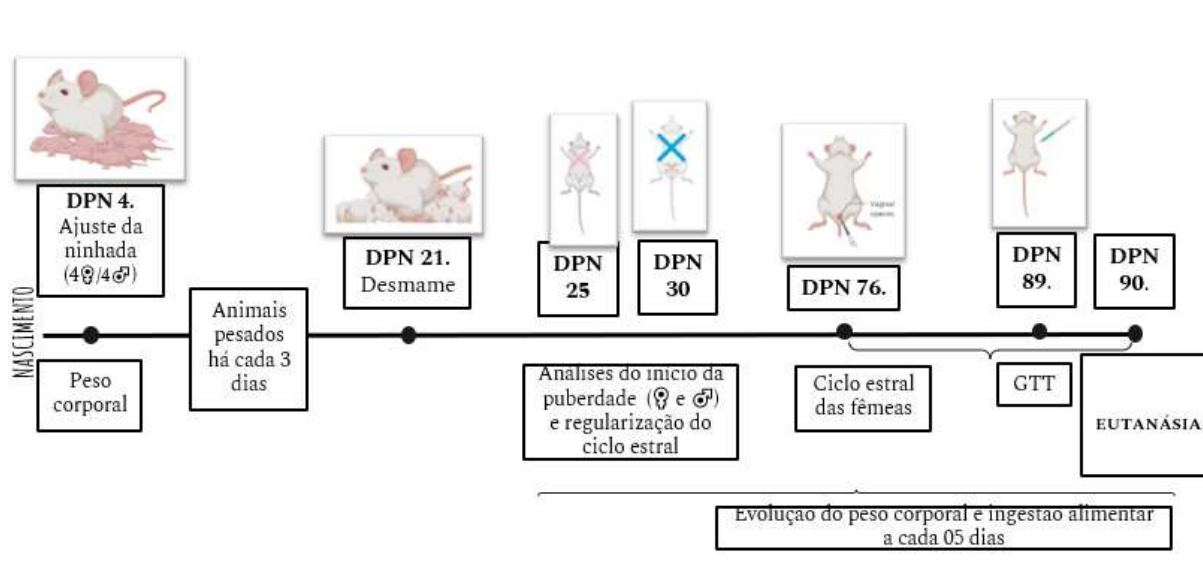


Fig. 4 – Protocolo experimental 02

#### 4.4 ÍNDICE DE LEE

O índice de Lee, tal como o índice de massa corporal (IMC) em humanos, pode ser utilizado como um preditor da obesidade em ratos. Assim, na manhã do dia das eutanásias, logo após a retirada da alimentação, foi medida a distância naso-anal e os animais foram pesados. O Índice de Lee foi calculado dividindo a raiz cúbica do peso corporal em gramas pela distância naso-anal em centímetros. (Bernardis & Patterson, 1968)

#### 4.5 ANÁLISES DA CONCENTRAÇÃO PLASMÁTICA DE COLESTEROL TOTAL, TRIGLICÉRIDES, LIPOPROTEÍNAS DE ALTA DENSIDADE (HDL), GLICOSE, ESTRADIOL E TESTOSTERONA

Logo em seguida à eutanásia, amostras de sangue foram coletadas em tubos com heparina, e foram centrifugadas a 2500 rpm na temperatura de 4° C por 20 minutos. O plasma resultante foi obtido e armazenado na temperatura de -20° C, para as dosagens de colesterol total, triglicerídeos, HDL, glicose, estradiol, testosterona, LH e FSH. O método utilizado para a análise das concentrações do plasma foi a espectrofotometria para colesterol total, triglicerídeos, HDL (kits comerciais – Vida Biotecnologia, MG) e glicose (kit comercial – Interkit), e ensaio imunoenzimático – ELISA – para a determinação do estradiol (EIA 2693; DRG Instruments GmbH), testosterona (EIA-1559; DRG Instruments GmbH), LH e FSH (Bio Advance Diagnostics), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.6 TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE (GTT)

Após 6 horas de privação alimentar, às 14h, uma pequena amostra de sangue foi coletada da cauda dos animais para estabelecer os valores de glicemia basal. Para o conhecimento desses valores, foram utilizadas fitas teste *Accu-Check Advantage II* (Roche, Taquara, RJ, Brasil) e um aparelho de medição de glicose no sangue. Logo após a medição da glicemia basal, foi realizada uma injeção intraperitoneal de glicose na concentração de 25% e dose de 1.0 g/kg de peso corporal do animal. Os valores de glicemia foram medidos as 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração intraperitoneal de glicose. Após a realização do teste, os animais retornaram as gaiolas com água e comida à vontade (Ferreira et al., 2022)

#### 4.7 ÍNDICE DE TRIGLICERÍDEOS E GLICOSE (TYG)

Para triagem da resistência à insulina, foram utilizadas as concentrações de triglicerídeos e glicose. O cálculo utilizado para a determinação do índice TyG foi:  $TyG = \ln [\text{Triglicerídeo de jejum (mg/dl)} \times \text{Glicose de jejum (mg/dl)}] / 2$  (Guerrero-Romero et al. 2010), no endereço eletrônico: <https://www.mdapp.co/tyg-index-calculator-359/>.

#### 4.8 INSTALAÇÃO DA PUBERDADE: ABERTURA VAGINAL, PRIMEIRO ESTRO, REGULAÇÃO DA CICLICIDADE ESTRAL E SEPARAÇÃO DO PREPÚCIO.

Para as descendentes fêmeas, observações vaginais diárias foram iniciadas no DPN 25 até a ocorrência da abertura vaginal. Uma vez constatada a abertura vaginal, foi realizado um lavado vaginal diariamente até a ocorrência do primeiro estro e regularização do ciclo estral (Dos Santos et. al, 2016). Em machos, a partir do DPN 30, a instalação da puberdade foi determinada pela conferência e ocorrência da separação prepucial (Gaytan, 1988).

#### 4.9. DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL

Foram colhidas amostras de fluídos vaginais diariamente às 10h, por lavado vaginal, cuidadosamente enxaguados entre as coletas para assegurar a remoção de qualquer resíduo de células do aparato. Uma ou duas gotas do lavado vaginal de cada animal foram colocadas numa lâmina histológica (Goldman, Murr e Cooper, 2007). Logo depois, a lâmina foi examinada num microscópio de luz, com um aumento de 10x. Essa análise microscópica foi realizada para analisar a proporção de células e tipos como determinados em pesquisas anteriores (Stopa et al., 2019), sendo usado o seguinte parâmetro: regulação do ciclo estral, com o último dia do 2º ciclo normalizado – proestro, estro, diestro 1, diestro 2. Do DPN 76 ao DPN 90, foi realizado o mesmo procedimento para colheita de amostras para determinação do – coeficiente de proestro, coeficiente de estro, diestro I e II (os valores foram obtidos pela razão entre o número de ocorrências de cada fase e o número de dias avaliados multiplicado por 100; e a duração do ciclo pela divisão do número de dias avaliado pelo número de dias em que foi constatado o proestro na fêmea (Stopa et. al, 2021).

O proestro foi identificado pela presença de aglomerados de células redondas e células epiteliais nucleadas, com uma aparência granular sob o microscópio, o estro, que foi identificado pela presença de muitas células cornificadas em forma de agulha (ou queratinizada), ou mais células arredondadas com bordas irregulares. O metaestro, que é um período de transição que compreende a primeira parte do diestro e é denominado diestro 1, foi caracterizado por uma combinação de leucócitos, células cornificadas e epiteliais arredondadas. O diestro 2 foi caracterizado por um conjunto

com leucócitos (Goldman, Murr e Cooper, 2007).

#### 4.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma análise exploratória foi realizada para verificar a distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variância pelo teste de Lavene. As variáveis que tiveram distribuição normal no teste de Shapiro Wilk e homogeneidade no teste de Lavene foram submetidas ao “Teste T de Student” ou ANOVA de medidas repetidas (RM ANOVA), que foram expressas graficamente pelas médias  $\pm$  do erro padrão da média. Os resultados foram apresentados como  $t(df) = \text{valor } t, \text{ valor } p$ . Para as variáveis peso corporal (DPN 21-90), ingestão alimentar (DPN 25-90) e teste de tolerância à glicose (GTT) foi utilizado a ANOVA de medidas repetidas (RM ANOVA). Nesses casos, o objeto foi representado por dias ou minutos, enquanto os grupos foram utilizados como fator entre os grupos. Quando a distribuição normal e/ou a homogeneidade não foram observadas, foi aplicado do teste de Mann-Whitney, expresso graficamente pelas medianas, 1º e 3º intervalo interquartil. O resultado foi apresentado como valor U e valor p. O valor de foi considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

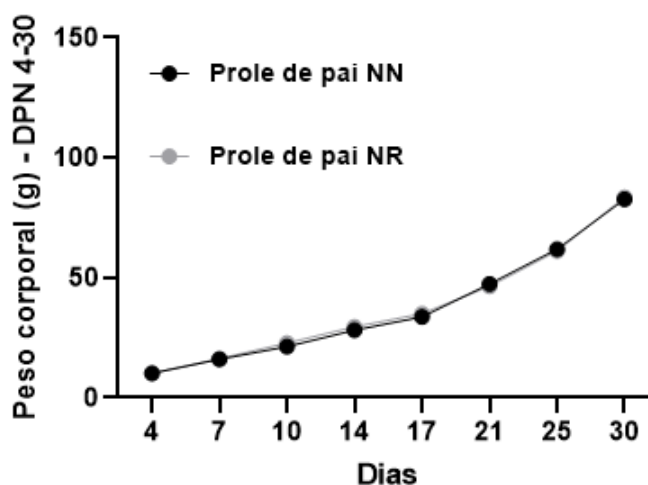
## 5. RESULTADOS

### 5.1. PRÉ-PÚBERES

#### 5.1.1 Fêmeas

##### 5.1.1.1 Parâmetros biométricos

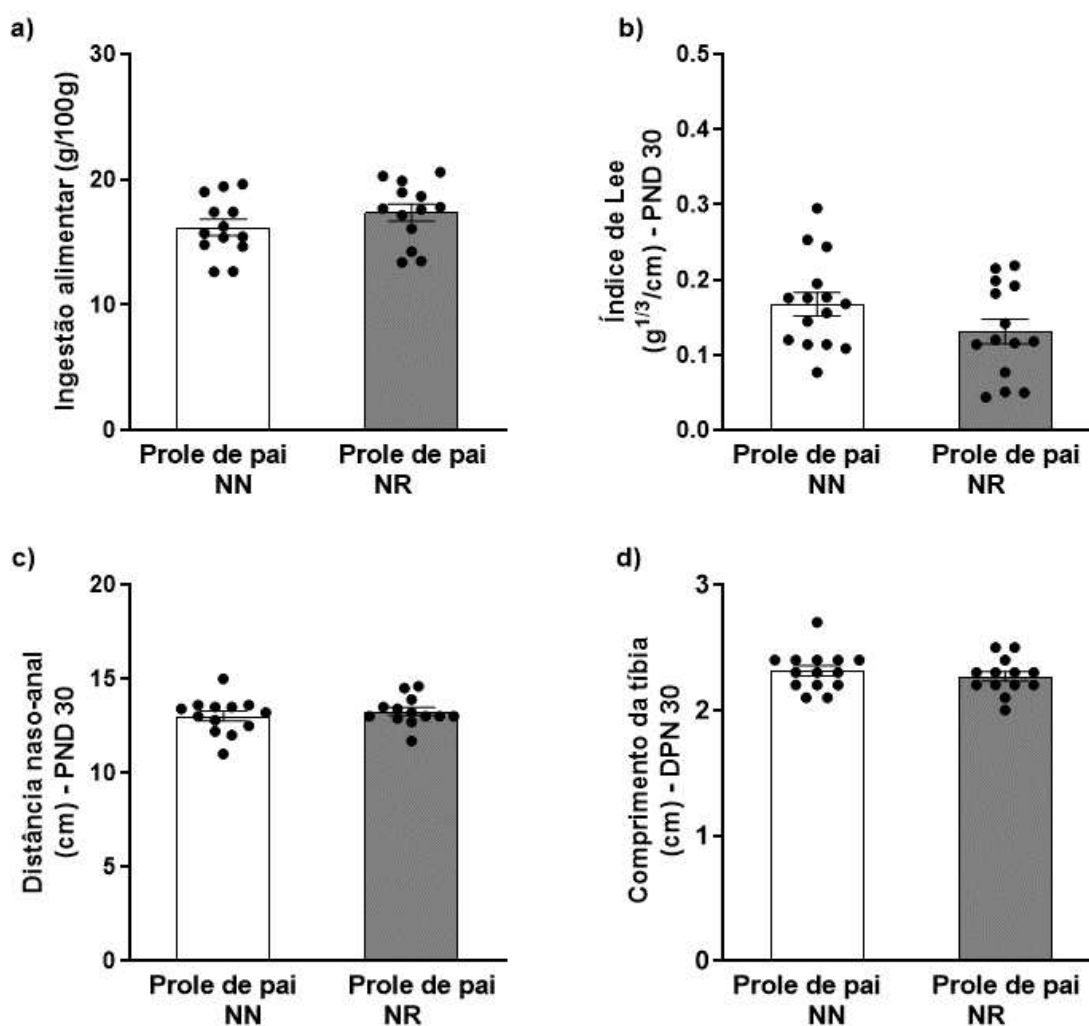
Do PDN 4 ao 30, não houve interação entre o fator dias e o fator grupos [F (7, 146) = 0,4771, p=0,85], sem efeitos entre grupos [ F ( 1, 21) = 0,1935, p=0,6645], mas com efeitos nos dias [F (3,158, 65,87) = 1290, p<0,0001] no peso corporal da prole feminina de pais de NN ou NR (Fig.5).



**Fig. 5.** Curva de peso corporal (g) do DPN 4-30 de proles femininas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05.

Além disso, na pré-adolescência, as descendentes femininas de pais com supernutrição neonatal por redução de ninhada não mostraram diferenças em relação ao grupo controle (ninhada normal) na ingesta alimentar [t (24) = 1,262, p= 0,2192] (Fig. 6a), Índice de Lee [t (25) = 1,164, p= 0,2556] (Fig. 6b), comprimento naso-anal [t (24) = 0,696, p= 0,4931] (Fig. 6c) e tamanho da tíbia [t (25) = 0,7782, p= 0,4437] (Fig.

6d).



**Fig. 6.** Ingestão alimentar (g/100g de peso corporal) de DPN 25-30 (a), índice de Lee (g<sup>1/3</sup>) (b), distância naso-anal (cm) (c) e comprimento da tíbia (cm) (d) proles femininas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

Ainda quanto aos parâmetros biométricos das fêmeas pré-púberes, não houve diferença entre os grupos no peso das adrenais [U = 104,5,  $p = 0,9914$ ], tecido adiposo perigonadal [t (25) = 1,164,  $p = 0,2556$ ] e retroperitoneal [t (27) = 1,745,  $p = 0,0923$ ], peso dos ovários [t (27) = 0,9154,  $p = 0,3681$ ], do útero [U = 99,  $p = 0,8047$ ], músculo gastrocnêmico [t (25) = 0,7052,  $p = 0,4872$ ] e sóleo [t (25) = 2,732,  $p = 0,7869$ ] (Tabela 1).

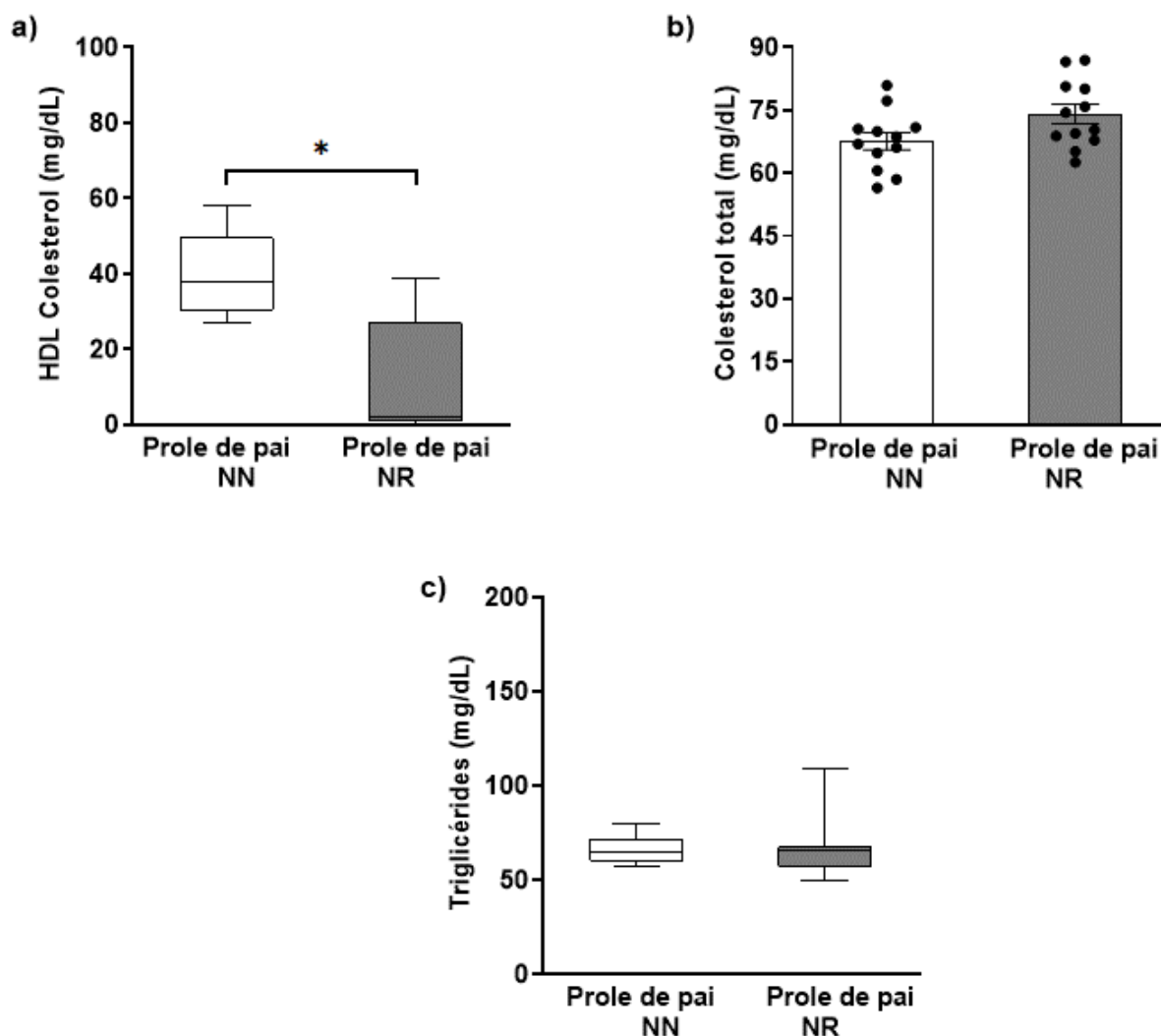
**Tabela 1.** Peso (g/100 peso corporal) do tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, adrenais, músculos sóleo e gastrocnêmico, útero, ovários e testículos de proles femininas e masculinas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR) na pré- puberdade.

	Fêmeas		Machos	
	PNN	PNR	PNN	PNR
Tecido adiposo perigonadal (g/100 g peso corporal)	0,335± 0,005 (14)	0,326 ± 0,004 (13)	0,237 ± 0,017 (14)	0,267 ± 0,014 (12)
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g peso corporal)	0,117 ± 0,009 (15)	0,094 ± 0,009 (14)	0,111 (0,099 – 0,141) (13)	0,0985 (0,727 – 0,144) (12)
Adrenais (g/100 g peso corporal)	0,0157 (0,013 - 0,018) (15)	0,015 (0,012 - 0,020) (14)	0,014 ± 0,0006 (14)	0,0163 ± 0,001 (12)
Músculo sóleo (g/100 g peso corporal)	0,041 ± 0,003 (14)	0,043 ± 0,004 (13)	0,038 (0,032 – 0,046) (14)	0,041 (0,035 – 0,044) (12)
Músculo gastrocnêmico (g/100 g peso corporal)	0,464 ± 0,018 (14)	0,447 ± 0,016 (13)	0,422 ± 0,007 (14)	0,472 ± 0,0187(12)*
Útero (g/100 g peso corporal)	0,069 (0,064 - 0,113) (15)	0,072 (0,057 - 0,105) (14)	—	—
Ovário (g/100 g peso corporal)	0,0246 ± 0,001 (15)	0,0267 ± 0,001 (14)	—	—
Testículos (g/100 g peso corporal)	—	—	0,359 ± 0,008 (14)	0,378± 0,009 (12)

O número de animais é mostrado entre parênteses. Dados expressos como média ± EPM para teste t de Student e mediana (1º- 3º intervalo interquartil) para teste de Mann-Whitney. \*p<0,05 PNN versus PNR.

### 5.1.1.2. Parâmetros lipídicos

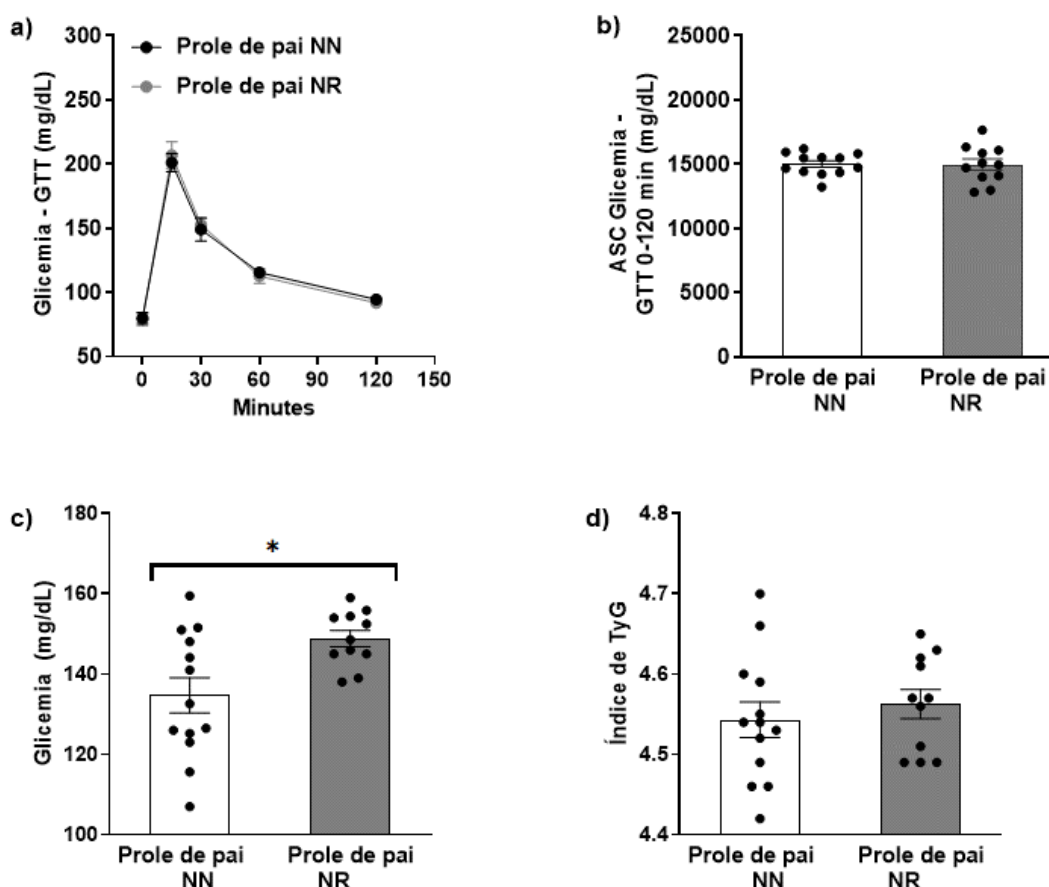
O grupo da prole feminina de pais de ninhada reduzida apresentou concentrações menores de HDL [ $U = 11$ ,  $p = 0,0003$ ] quando comparadas com a prole feminina de pais de ninhada normal (Fig. 7a), sem apresentar, contudo, diferenças nas concentrações de colesterol total [ $t(22) = 2,067$ ,  $p = 0,0507$ ] (Fig. 7b) e triglicérides [ $U = 78$ ,  $p = 0,7623$ ] entre os grupos (Fig. 7c).



**Fig. 7.** Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles femininas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

## 5.1.1.3 Parâmetros glicêmicos.

No teste de tolerância à glicose não houve interação entre o fator minuto e o fator grupo [F (4, 84) = 0,2499,  $p=0,909$ ], nem efeitos entre os grupos [F (1, 21) = 0,01587,  $p=0,909$ ], mas com efeitos nos minutos [F (4, 84) = 156,6,  $p<0.0001$ ] na curva glicêmica, tanto das fêmeas descendentes de machos de ninhada reduzida quanto nas descendentes de ninhada normal (Fig. 8a). Também, não houve diferença na área sob a curva do GTT (ASC) [t (21) = 0,0895,  $p = 0,9295$ ] entre os grupos (Fig. 8b). Todavia, na pré-puberdade, a prole feminina de pais de ninhada reduzida apresentou maior concentração de glicose quando comparadas ao grupo controle [t (22) = 2,753,  $p = 0,0116$ ] (Fig. 8c), sem, contudo, apresentar diferença no índice Tyg [t (22) = 0,6702,  $p = 0,5097$ ] (Fig. 8d).



**Fig. 8.** Glicemia durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a) e área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicemia (mg/dL) e Índice TyG de proles femininas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ .

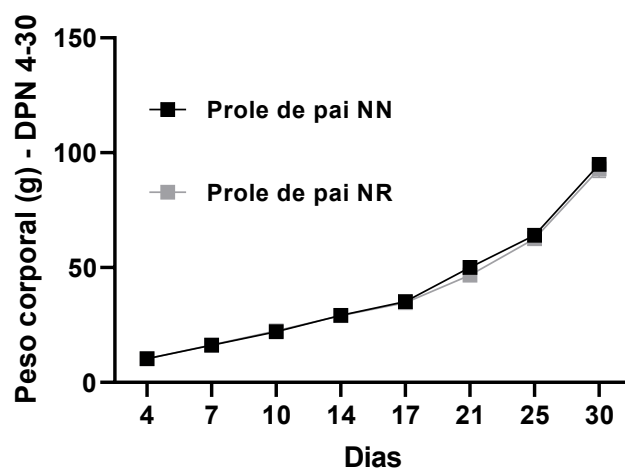
## 5.1.2. Machos

## 5.1.2 Machos

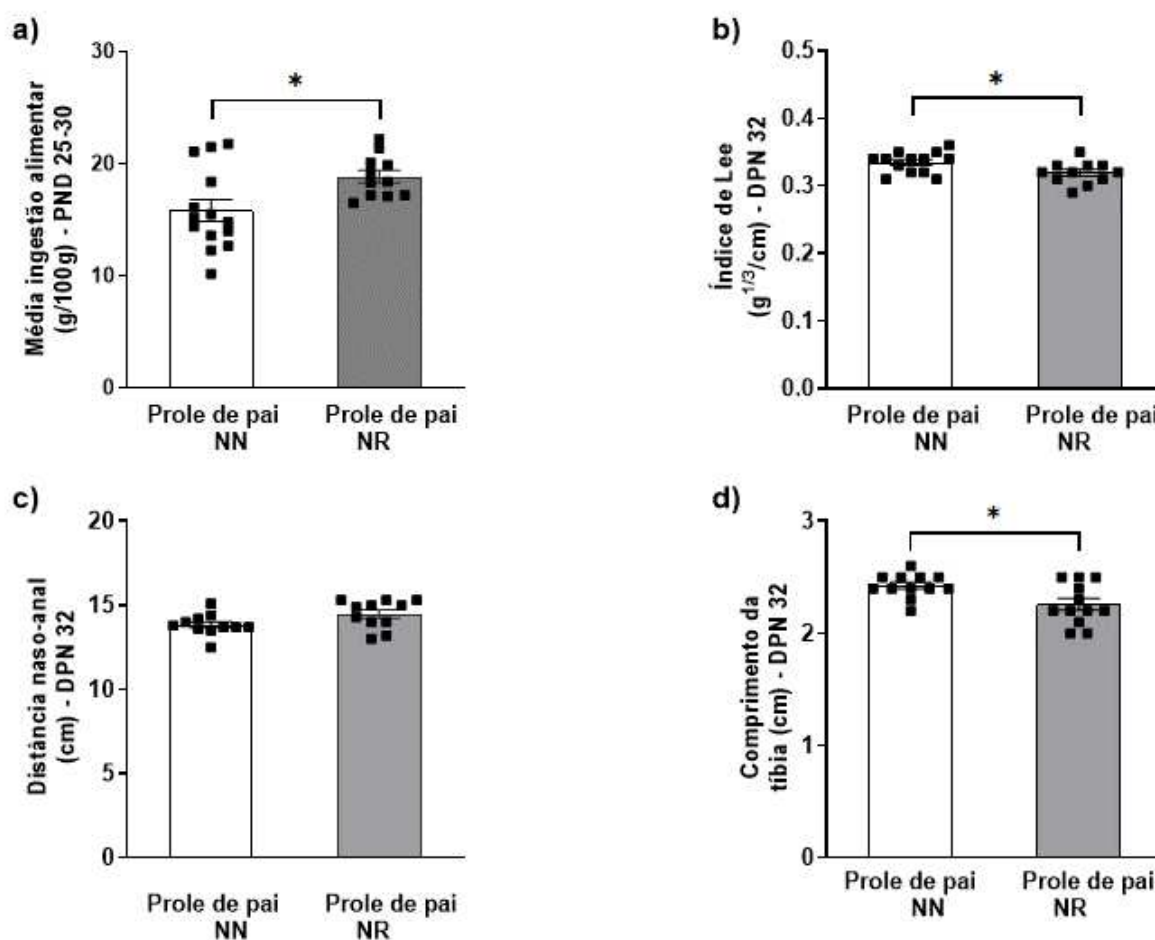
### 5.1.2.1 Parâmetros biométricos

No que diz respeito aos descendentes machos, do DPN 04 ao dia 30 não houve interação ao o fator dias com o fator grupo [ $F(7, 160) = 0,3407, p=0,9341$ ], sem efeitos no grupo [ $F(1, 160) = 1,262, p=0,263$ ], mas com efeito nos dias [ $F(7, 160) = 622,6, p<0,0001$ ] no peso corporal dos filhos de machos de ninhada normal e de ninhada reduzida (Fig. 9). Ademais, os descendentes de pais de ninhada reduzida apresentaram menor Índice de Lee [ $t(22)=2,372, p= 0,0268$ ] (Fig. 10b) e menor comprimento da tíbia [ $t(22)=2,731, p= 0,0122$ ], quando comparados com os descendentes de pais de ninhada normal (Fig. 10d), apesar da maior ingestão alimentar do dia pós-natal 25 ao 30 [ $t(23)=2,534, p= 0,0185$ ] (Fig. 10a) e peso do músculo gastrocnêmico [ $t(24) = 2,622, p = 0,015$ ] (Tabela 1).

Porém, não foram observadas diferenças a distância naso-anal [ $t(20)=2,028, p= 0,0561$ ] (Fig. 10c), peso do tecido adiposo perigonadal [ $t(24) = 1,290, p = 0,2094$ ] e retroperitoneal [ $U= 62,5, p = 0,2795$ ], testículos [ $t(24) = 1,5, p = 0,1467$ ], glândulas adrenais [ $t(24) = 1,661, p = 0,1098$ ], músculos sóleo [ $U= 79,5, p = 0,8296$ ] (Tabela 1).



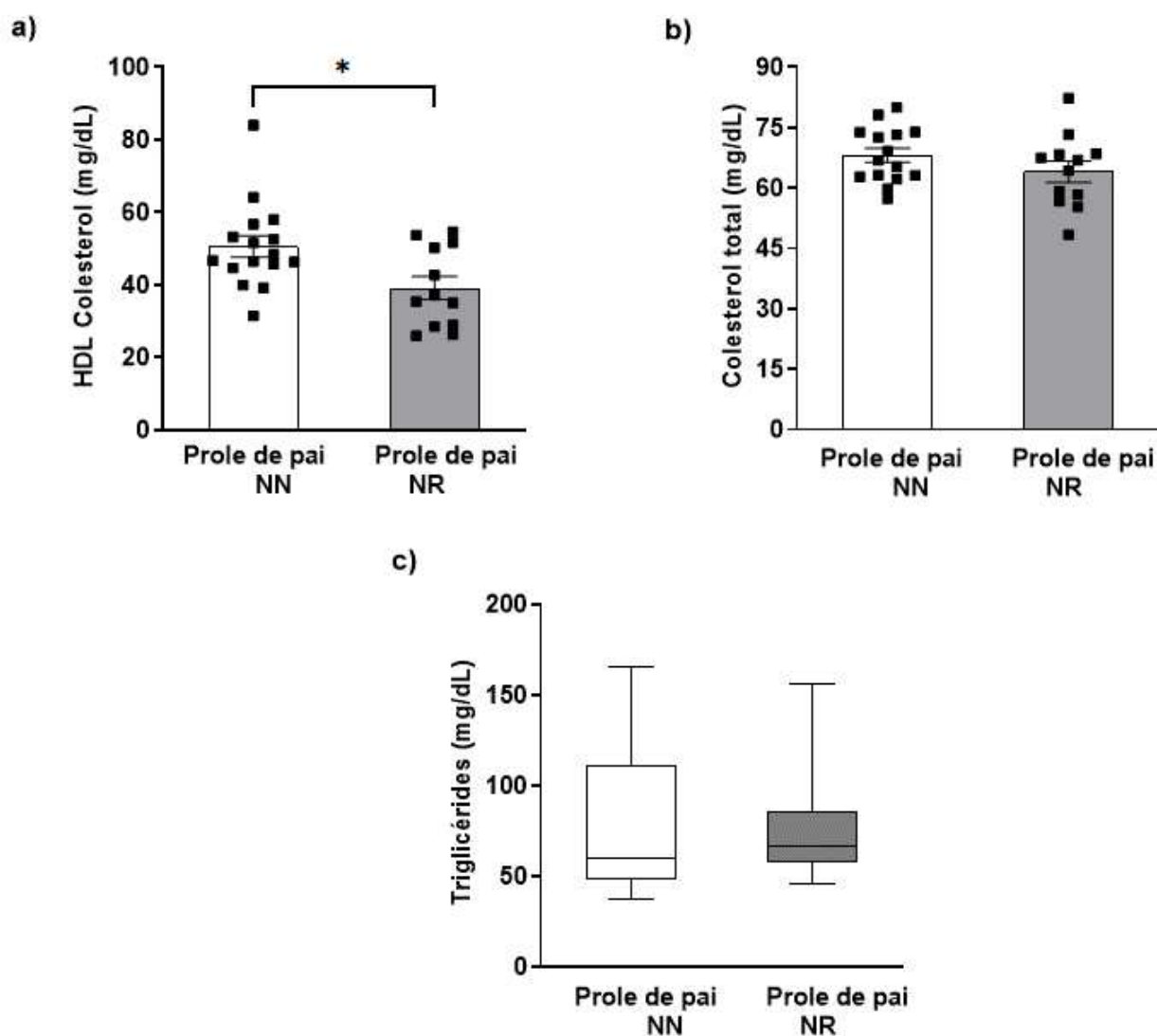
**Fig. 9.** Curva de peso corporal (g) do DPN 4-30 de proles masculina de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ .



**Fig. 10.** Ingestão alimentar (g/100g de peso corporal) do DPN 25-30 (a), índice de Lee (g<sup>1/3</sup>) (b), distância naso-anal (cm) (c) e comprimento da tíbia (cm) (d) de proles masculinas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média ± EPM. \*p < 0,05.

#### 5.1.2.2. Parâmetro lipídico

No que tange o perfil lipídico, os machos descendentes de pais de ninhada reduzida apresentaram menores concentrações de HDL [t (26) = 2,590, p = 0,0155], quando comparados com o grupo descendente de pais de ninhada normal (Fig. 11a), sem diferença entre os grupos no colesterol total [t (25) = 1,305, p = 0,2039] (Fig. 11b), e triglicerídeos [U = 78, p = 0,4228] (Fig. 11c).

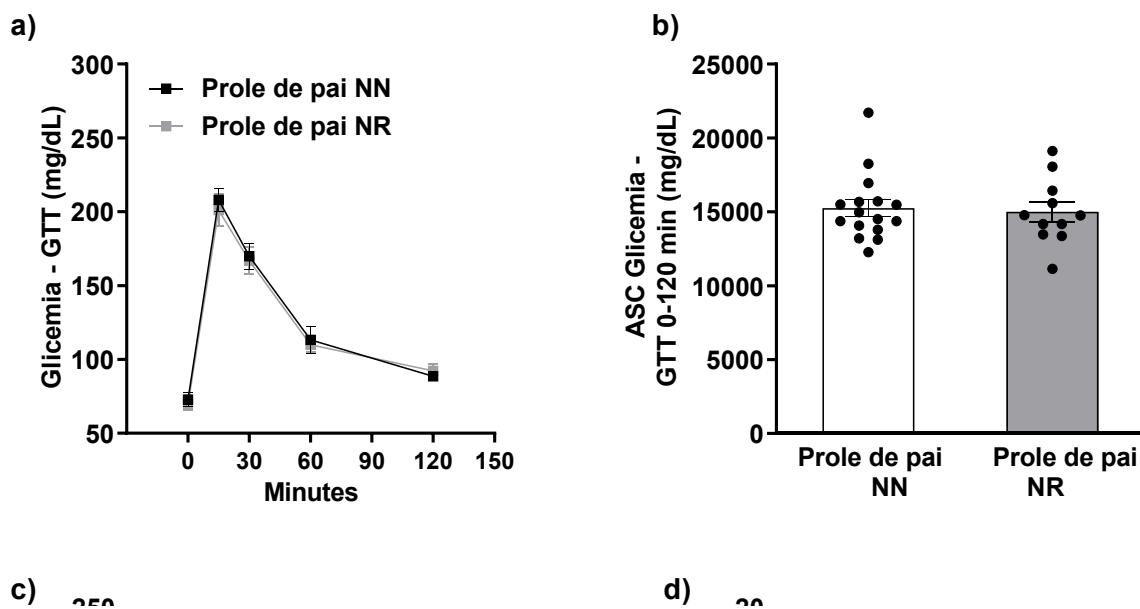


**Fig. 11.** Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles masculinas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis. \*p < 0,05.

### 5.1.2.3. Parâmetro glicêmico

Quanto ao perfil glicêmico não houve interação entre o fator minutos com o fator grupo [F (4, 100) = 0,1676, p=0,9544], sem efeito entre os grupos [F (1, 25) = 0,1776, p=0,6773], mas com efeito os minutos [F (4, 100) = 139,1, p<0.0001] após a carga glicêmica de machos de pais de ninhada normal ou reduzida (Fig. 12a). Bem como houve diferença na área sob a curva (ASC) do teste de tolerância à glicose [t (25) =

1,804,  $p = 0,7858$ ] entre os grupos (Fig. 12b). Por fim, não houve diferença na glicemia [t (26) = 0,2169,  $p = 0,83$ ] (Fig. 12c) e no Índice Tyg [t (26) = 0.1296,  $p = 0.8979$ ] (Fig. 12d).



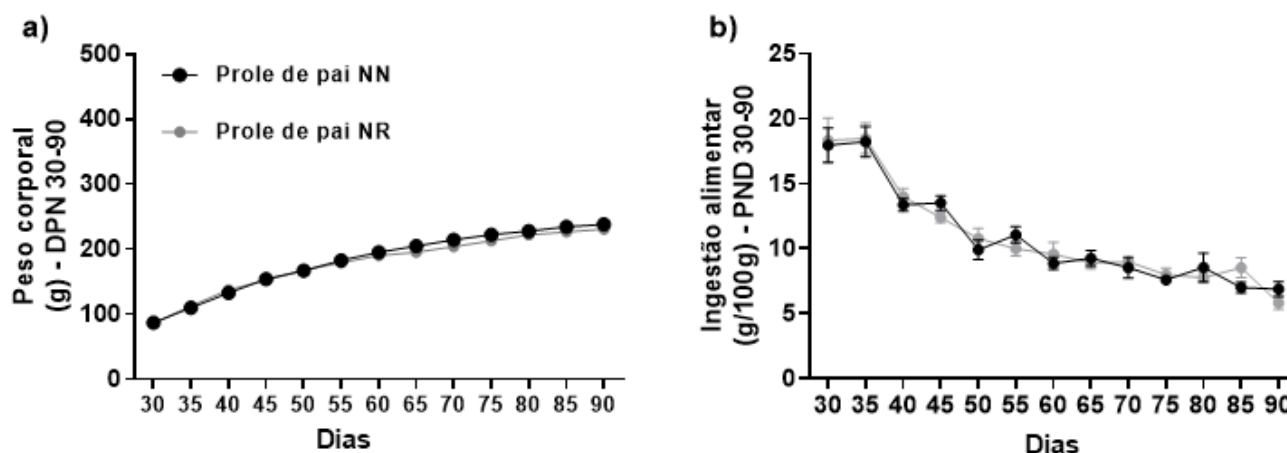
**Fig. 12.** Glicemia durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a) e área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicemia (mg/dL) e Índice TyG de proles masculinas na pré-puberdade de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ .

## 5.2 ADULTOS

### 5.2.1 Fêmeas

#### 5.2.1.1. Parâmetros biométricos

Do DPN 30 ao DPN 90, houve interação entre os fatores dia e grupos [F (12, 282) = 2,74, p=0,0016] no peso corporal de fêmeas descendentes de pai de ninhada normal e de ninhada reduzida, sem diferenças no peso corporal entre os grupos nesses dias (Fig. 13a). Não houve interação entre o fator dia e o fator grupo [F (12, 272) = 0,5825, p=0,8558], sem efeitos nos grupos [F (1, 24) = 0,02173, p=0,8840], mas com efeitos nos dias na ingestão alimentar do DPN 30 ao DPN 90 [F (4,328, 98,1) = 47,29, p<0.0001] de fêmeas descendentes de pais de ninhada normal e ninhada reduzida (Fig. 13b).



**Fig. 13.** Peso corporal (g) DPN 30-90 (a) e Ingestão alimentar (g/100 g) DPN 30-90 (b) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \*p < 0,05.

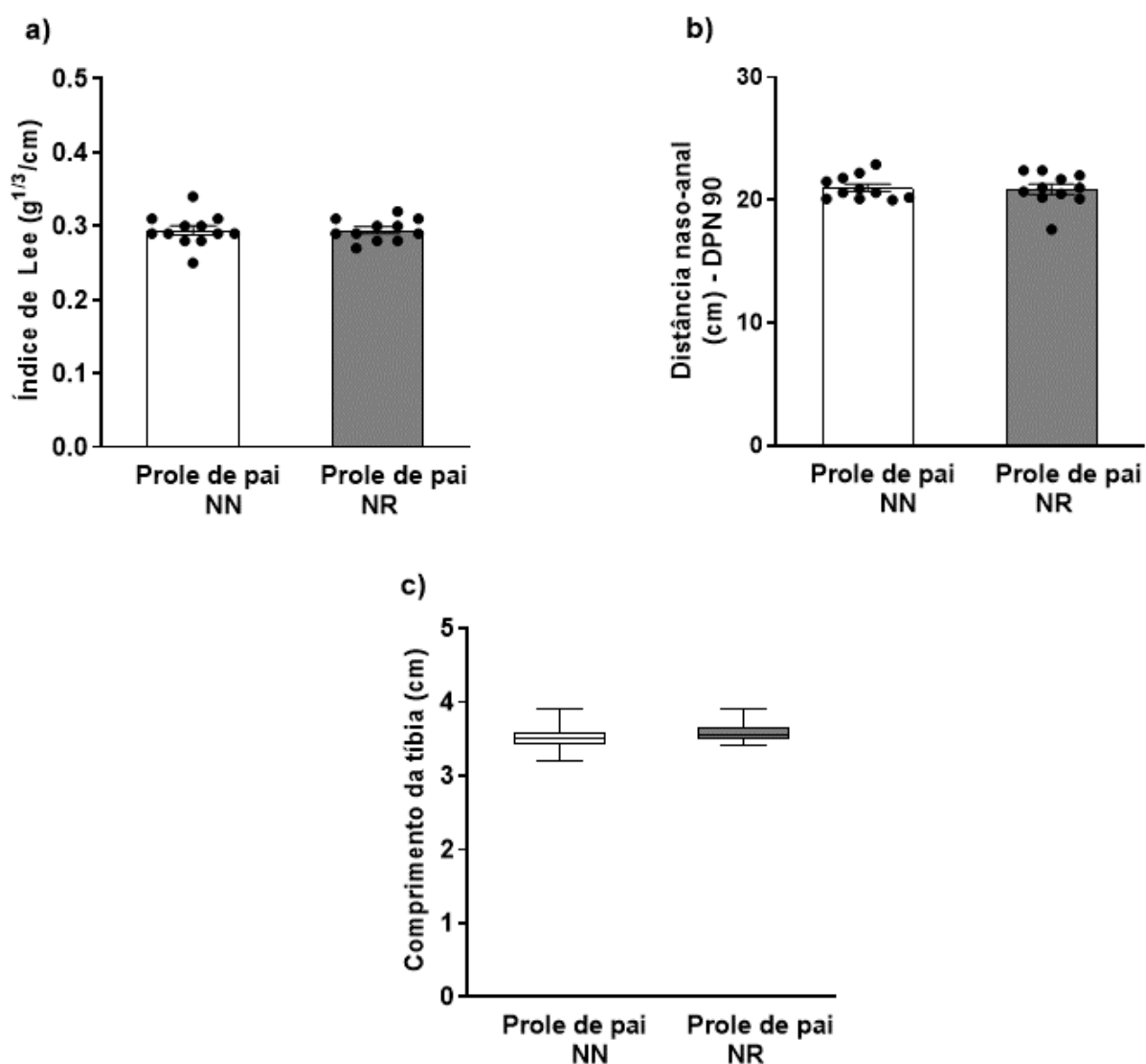
As fêmeas adultas filhas de pai de ninhada reduzida apresentaram um maior peso da glândula adrenal [U = 22.5, p = 0,0009], quando comparadas com as fêmeas adultas filhas de pai de ninhada normal (Tabela 2) sem, contudo, apresentar diferença no Índice de Lee [t (25) = 0,04846, p = 0,9618] (Fig. 14a), distância naso-anal [t (20) = 0,2338, p = 0,8175] (Fig. 14b), comprimento da tíbia [t (24) = 1,173, p = 0,2522] (fig. 14c), tecido adiposo perigonadal [t (24) = 1,101, p = 0,1224], e retroperitoneal [U = 59,

$p = 0,2067$ ], além de não apresentar diferenças entre os músculos gastrocnêmico [U = 59,  $p = 0,2116$ ] e sóleo [U = 79,  $p = 0,81$ ] (Tabela 2).

**Tabela 2.** Peso (g/100 peso corporal) do tecido adiposo perigonadal e retroperitoneal, adrenais, músculos sóleo e gastrocnêmico, útero, ovários e testículos na vida adulta de proles femininas e masculinas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR).

	Fêmeas		Machos	
	PNN	PNR	PNN	PNR
Tecido adiposo perigonadal (g/100 g peso corporal)	1,879 ± 0,197(14)	1,501 ± 0,110 (12)	1,473 ± 0,095(15)	1,350 ± 0,122 (14)
Tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g peso corporal)	0,750 (0,641 – 0,884) (14)	0,8595 (0,593 – 1,439) (12)	0,936 ± 0,048 (15)	0,897 ± 0,077 (14)
Adrenais (g/100 g peso corporal)	0,016 (0,014 - 0,021) (14)	0,0240 (0,019 - 0,027) (12)*	0,0072 ± 0,0004 (15)	0,0086 ± 0,0005 (14)
Músculo sóleo (g/100 g peso corporal)	0,043 (0,035 – 0,053) (12)	0,043 (0,038 - 0,062) (14)	0,043 (0,040 – 0,078) (15)	0,0425 (0,367 – 0,610) (14)
Músculo gastrocnêmico (g/100 g peso corporal)	0,501 (0,436 – 0,569) (12)	0,563 (0,492 – 0,606) (14)	0,479 (0,446 – 0,520) (15)	0,469 (0,442 – 0,568) (14)
Útero (g/100 g peso corporal)	0,197 ± 0,0121 (12)	0,224 ± 0,0168 (14)	—	—
Ovário (g/100 g peso corporal)	0,0245 ± 0,00178 (12)	0,0255 ± 0,00164 (14)	—	—
Testículos (g/100 g peso corporal)	—	—	0,392 ± 0,008 (15)	0,403 ± 0,0104 (14)

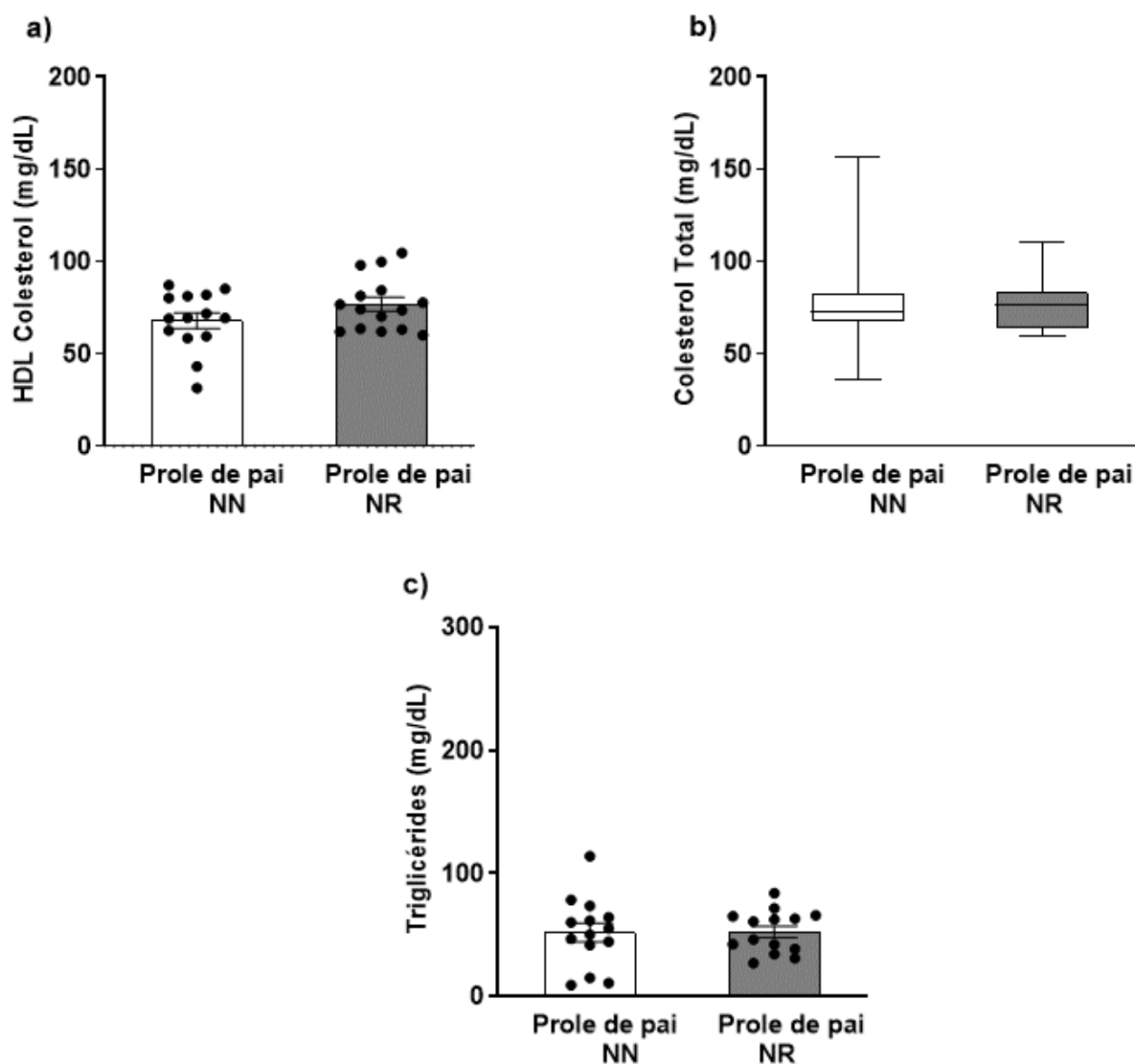
O número de animais é mostrado entre parênteses. Dados expressos como média ± DPM para teste t de Student e mediana (1<sup>o</sup>- 3<sup>o</sup> intervalo interquartil) para teste de Mann-Whitney. \* $p < 0,05$  NN versus NR.



**Fig. 14.** Índice de Lee ( $g^{1/3}$ ) (a), distância naso-anal (cm) (b) e comprimento da tíbia (cm) (c) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

#### 5.2.1.2. Parâmetros lipídicos

Os grupos também não demonstraram diferenças nas concentrações de HDL [ $t = (27) = 1,561$ ,  $p = 0,1302$ ] (Fig. 15a), colesterol total [ $U = 100$ ,  $p = 0,8467$ ] (Fig. 15b), e triglicérides [ $t (26) = 0,07210$ ,  $p = 0,9431$ ] (Fig. 15c).

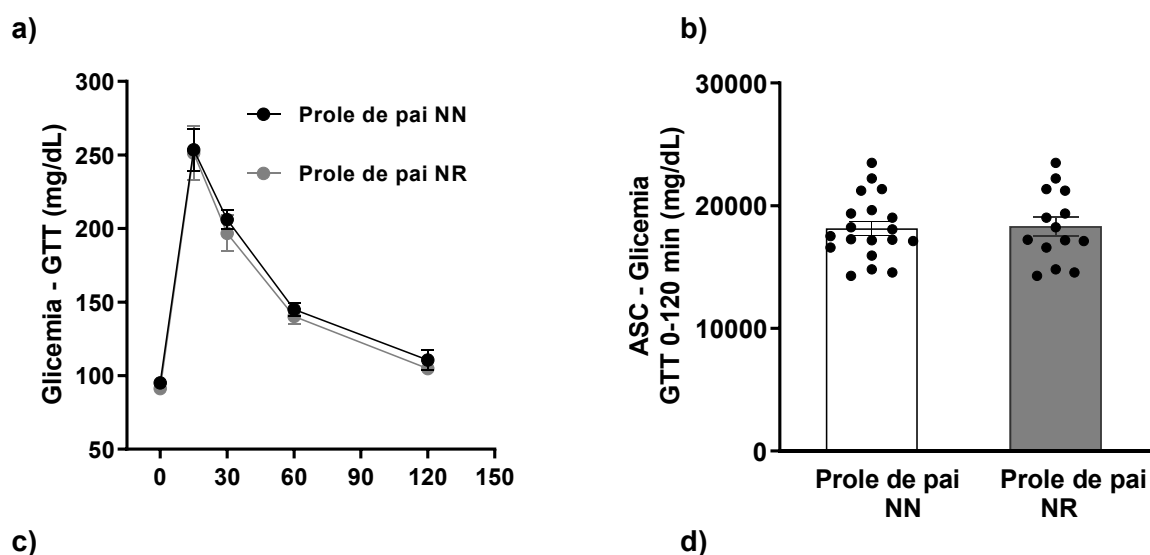


**Fig. 15.** Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

### 5.2.1.3. Parâmetros glicêmicos

No GTT, não houve interação entre o fator minutos e grupos [F (4, 104) = 0,05424,  $p=0,9944$ ], não houve efeitos no grupo [F (1, 26) = 0,3718,  $p=0,5473$ ], com efeito do fator minutos [F (4, 104) = 143,8,  $p<0.0001$ ] na glicemia após a sobrecarga de glicose nas fêmeas descendentes de pai de ninhada normal e ninhada reduzida (Fig. 16a), bem como não houve diferenças significativas na área sob a curva entre

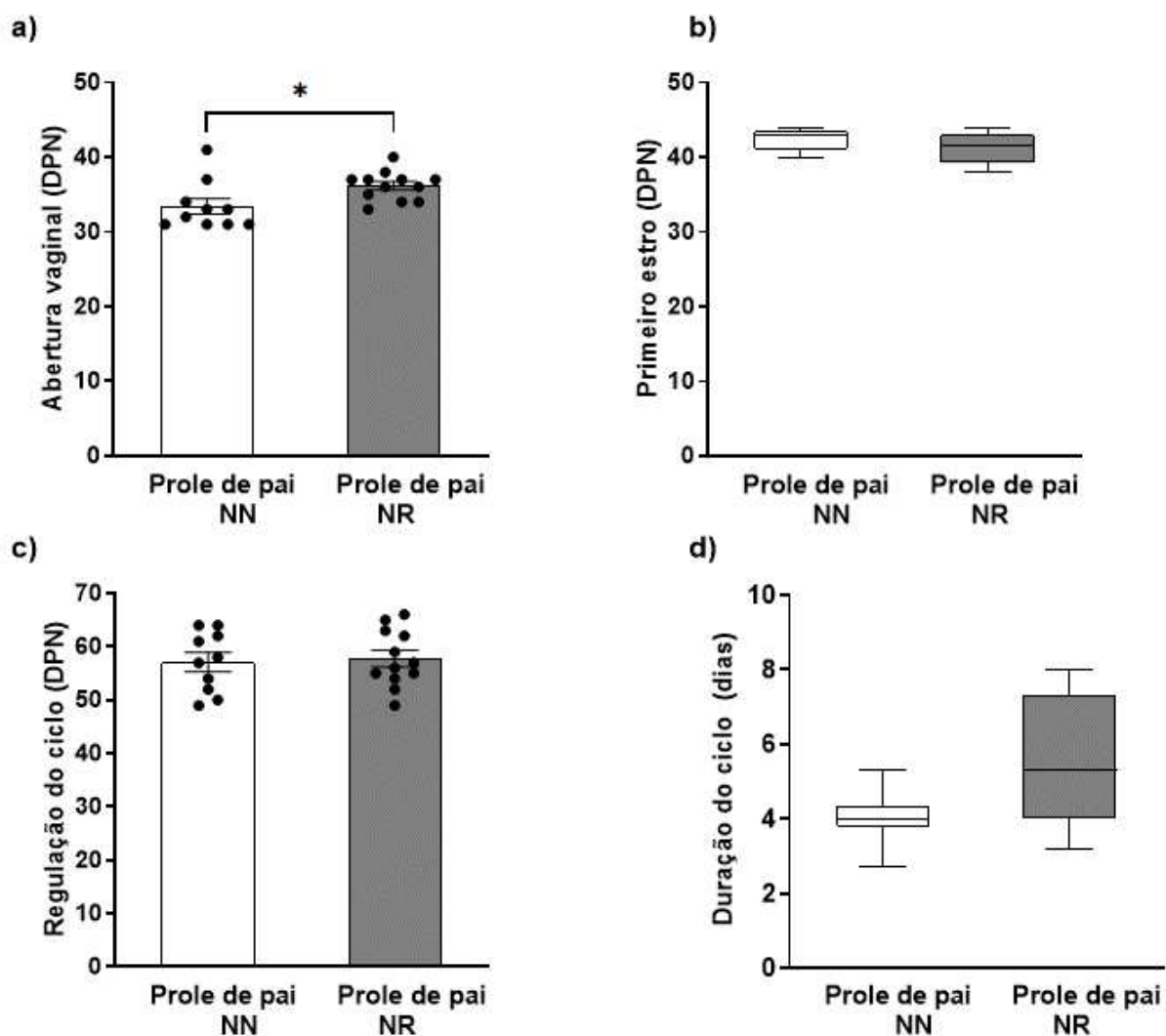
os grupos [ $t(31) = 0,1781$ ,  $p = 0,8598$ ] (Fig. 16b). Por fim, também não houve diferenças entre os grupos na concentração de glicose [ $t(22) = 0,5587$ ,  $p = 0,5820$ ] (Fig. 16c) e no Índice Tyg [ $U = 67,5$ ,  $p = 0,8312$ ] (Fig. 16d) entre as fêmeas de pai de ninhada normal e ninhada reduzida.



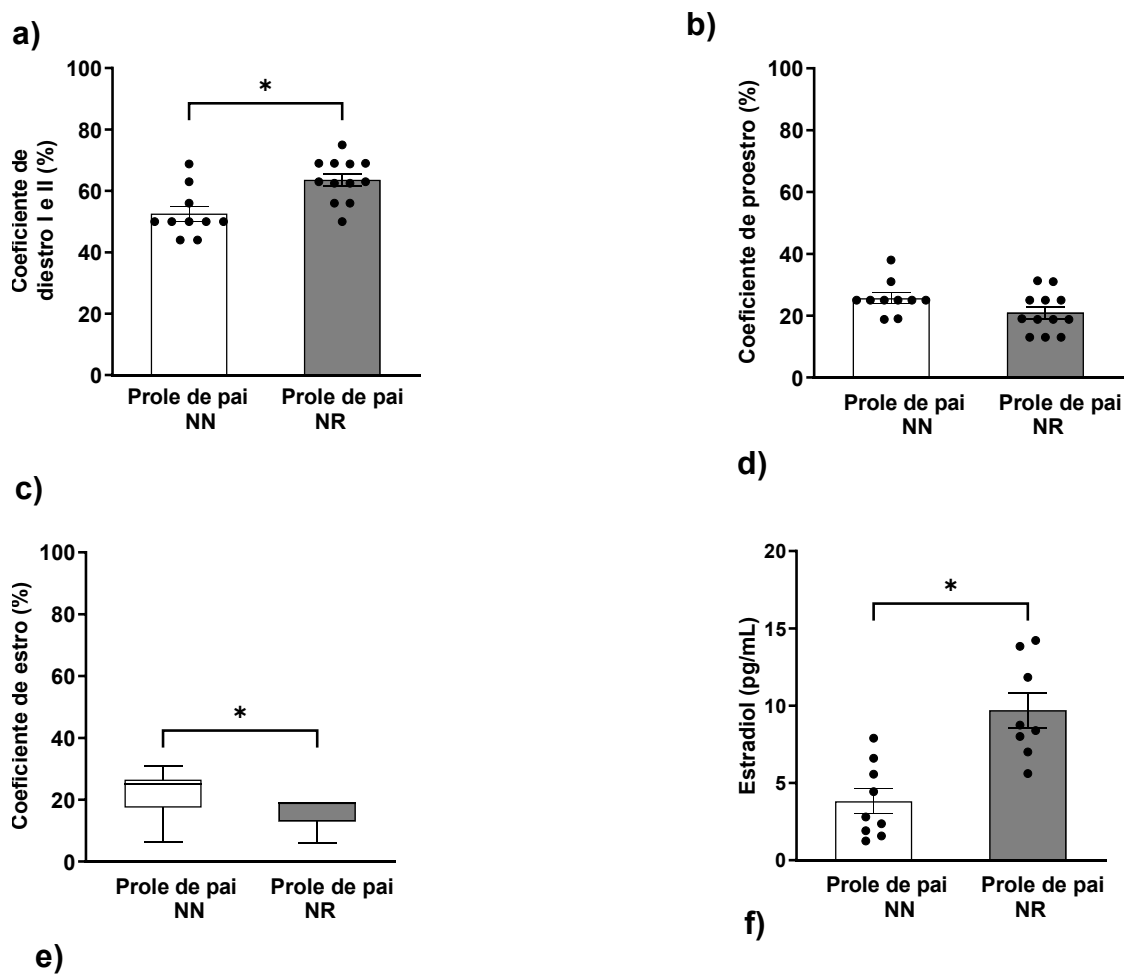
**Fig. 16.** Glicemia durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a) e área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicose (mg/dL) e Índice TyG de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1º e 3º intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

#### 5.2.1.4 Parâmetros reprodutivos

Durante o desenvolvimento, as fêmeas descendentes de pais de ninhada reduzida demonstraram um atraso na abertura vaginal [ $t(20) = 2,459$ ,  $p = 0,0232$ ], quando comparada às descendentes de pai de ninhada normal (Fig.17a), sem diferenças entre os grupos no primeiro estro [ $U = 42$ ,  $p = 0,4107$ ] (Fig. 17b), na regulação da ciclicidade [ $t(20) = 0,2778$ ,  $p = 0,7840$ ] (Fig. 17c), e na duração dos ciclos estrais [ $U = 36$ ,  $p = 0,0988$ ] (Fig. 17d). Contudo, fêmeas adultas, filhas de pai de ninhada reduzida, apresentaram maior coeficiente de diestro I e II [ $t(20) = 3,764$ ,  $p = 0,0024$ ] (Fig.18a) e menor coeficiente de estro [ $U = 25,5$ ,  $p = 0,0176$ ] (Fig. 18c), comparadas ao grupo controle. Não houve diferenças entre os grupos no coeficiente de proestro [ $t(20) = 1,807$ ,  $p = 0,0858$ ] (Fig. 18b), assim como não houve diferença significativa no peso dos ovários [ $t(24) = 0,4069$ ,  $p = 0,6877$ ] e do útero [ $t(24) = 1,271$ ,  $p = 0,2159$ ] (Tabela 2). Por fim, a prole feminina de pais de ninhada reduzida apresentou concentração de estradiol na vida adulta mais elevada do que as fêmeas do grupo controle [ $t(15) = 4,319$ ,  $p = 0,0006$ ] (Fig. 18d), sem apresentar diferença nas concentrações de LH [ $t(10) = 0,2427$ ,  $p = 0,8079$ ] (Fig. 18e) e FSH [ $t(14) = 0,4431$ ,  $p = 0,6644$ ] (Fig. 18f).



**Fig. 17.** Abertura vaginal (DPN) (a), primeiro estro (DPN) (b), regulação do ciclo (DPN) (c), e duração do ciclo (dias) (d) de proles femininas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

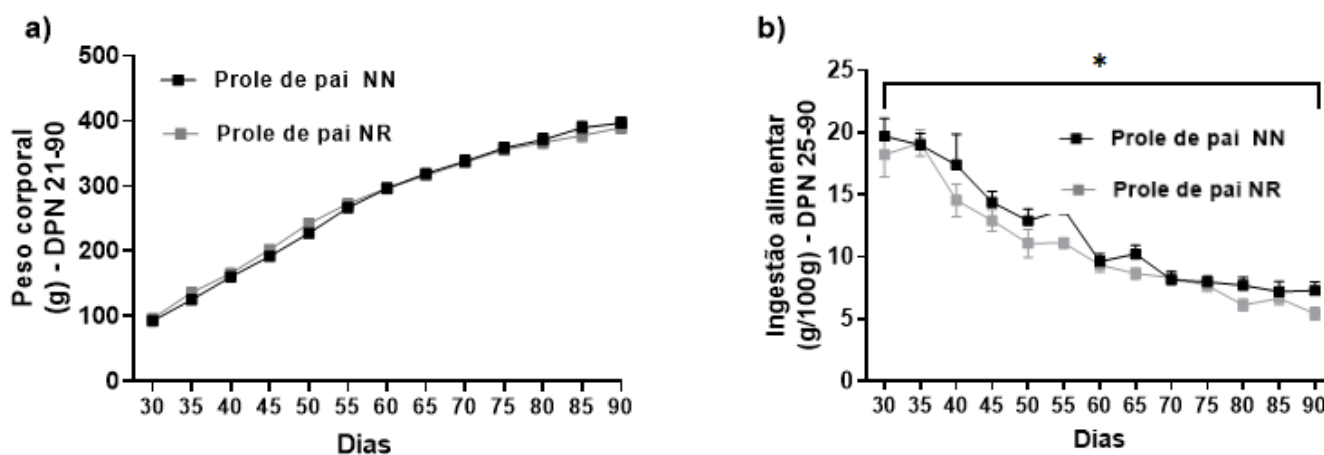


**Fig. 18.** Coeficiente de diestro I e II (%) (a), coeficiente de proestro (%) (b), coeficiente de estro (%) (c), estradiol plasmático (ng/mL) (d), LH (UI/L) (e) e FSH (UI/L) (f) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

## 5.2.2 Machos

### 5.2.2.1. Parâmetros biométricos

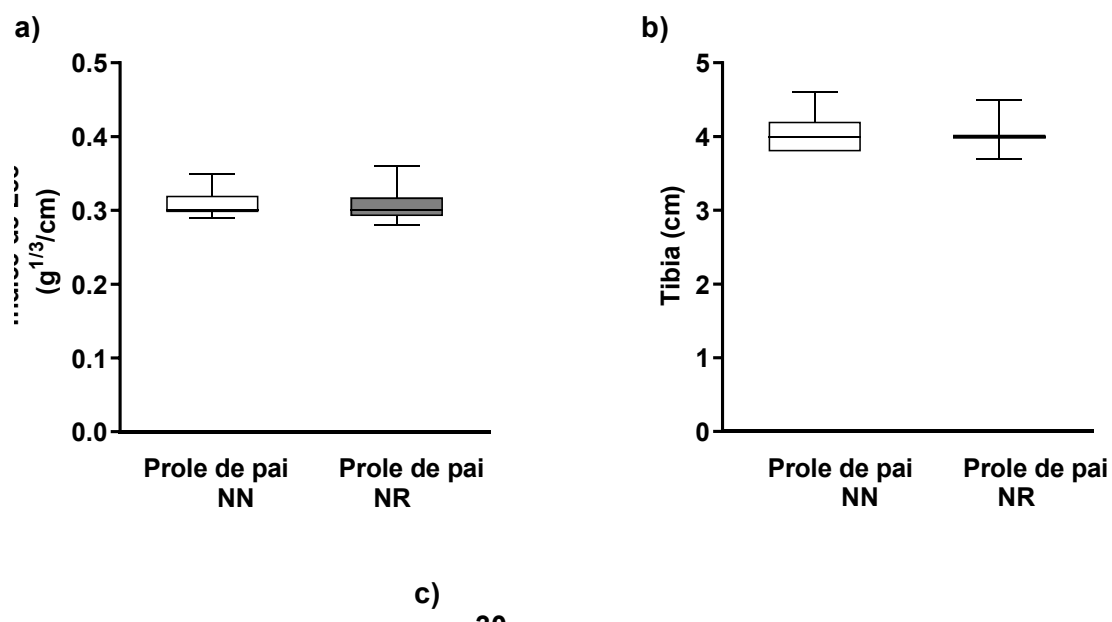
Nos machos do dia pós-natal 30 ao dia pós-natal 90, não houve interação entre o fator dia e fator grupos [ $F(12, 303) = 1,763, p=0,0536$ ], bem como não houve efeito no fator grupos [ $F(1, 26) = 0,06251, p=0,8045$ ] no peso corporal. Todavia, houve efeito nos dias [ $F(2,46, 62,12) = 1288, p<0,0001$ ] no peso corporal tanto no grupo controle quanto no grupo experimental (Fig. 19a). Não houve interação entre o fator dias e o fator grupos, [ $F(12, 292) = 0,6332, p=0,8134$ ], com efeitos no grupos [ $F(1, 26) = 6,407, p=0,0178$ ] e dias [ $F(3,773, 91,81) = 47,33, p<0,0001$ ] na ingestão alimentar, indicando que machos descendentes de pais de ninhada reduzida tiveram uma menor ingestão alimentar do que os descendentes de pai de ninhada normal do DPN 30 ao DPN 90 (Fig.19b).



**Fig. 19.** Peso corporal (g) DPN 30-90 (a), Ingestão alimentar (g/100 g) DPN 30-90 (b) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$ .

Ainda em relação aos parâmetros biométricos, não houve diferenças entre os machos adultos descendentes de pai de ninhada reduzida ou normal no que diz respeito ao Índice de Lee [ $U = 79, p = 0,8137$ ] (Fig. 20a), peso do tecido adiposo perigonadal [ $t(27) = 0,7974, p = 0,4322$ ] e retroperitoneal [ $t(27) = 0,4324, p = 0,6689$ ] (Tabela 2), comprimento da tíbia [ $U = 99,5, p = 0,8142$ ] (Fig. 20b), distância naso-anal

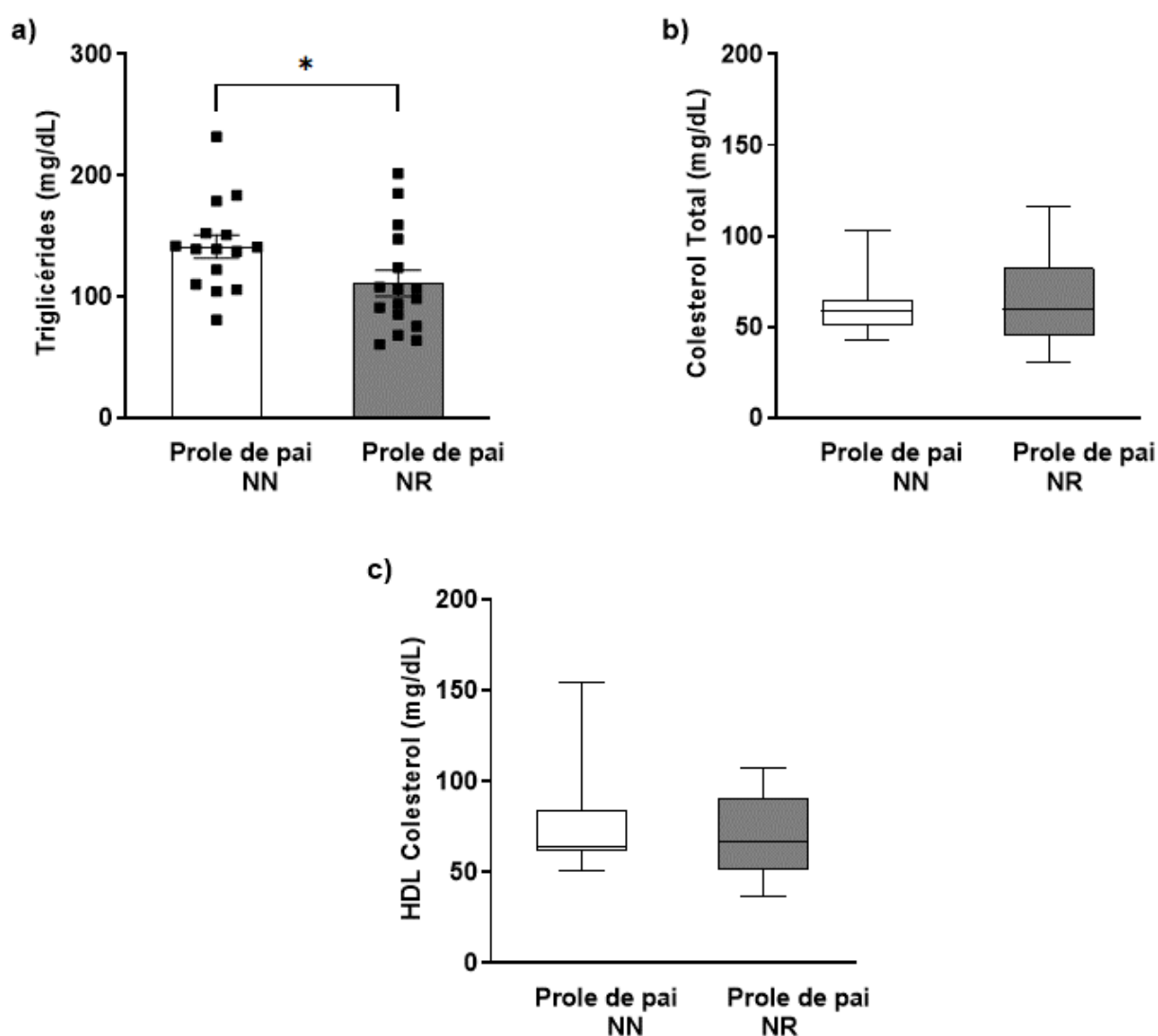
[ $t(20) = 0,06759$ ,  $p = 0,9468$ ] (Fig. 20c), glândulas adrenais [ $t(27) = 1,537$ ,  $p = 0,136$ ], testículos [ $t(27) = 0,7946$ ,  $p = 0,4338$ ], músculo gastrocnêmico [ $U = 105$ ,  $p > 0,9999$ ] e sóleo [ $U = 91$ ,  $p = 0,5535$ ] (Tabela 2).



**Fig. 20.** Índice de Lee ( $g^{1/3}$ ) (a), distância naso-anal (cm) (b) e comprimento da tíbia (cm) (c) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1º e 3º intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

## 5.2.2.2. Parâmetros lipídicos

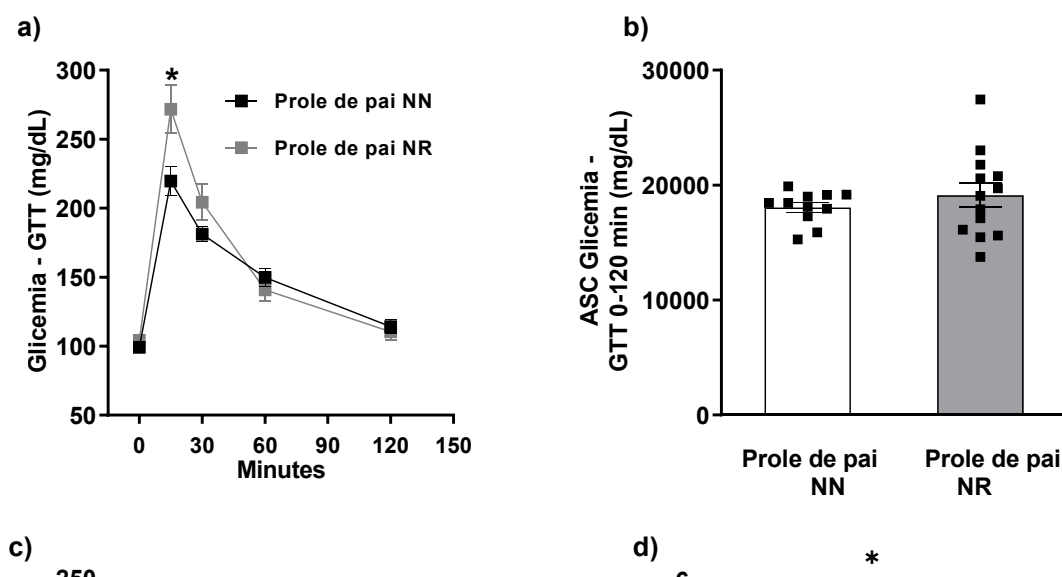
Quanto ao perfil lipídico, a prole masculina adulta de pais de ninhada reduzida apresentou menor concentração de triglicérides [ $t(29) = 2,113$ ,  $p = 0,0433$ ], quando comparados ao filhos de pais de ninhada normal (Fig 21a). Porém, não foram encontradas diferenças entre os grupos no colesterol total [ $U = 115,5$ ,  $p = 0,8685$ ] (Fig.21b) e HDL [ $U = 107$ ,  $p = 0,6185$ ] (Fig. 18c).



**Fig. 21.** Colesterol HDL (mg/dL) (a), Colesterol total(mg/dL) (b), Triglicérides (mg/dL) (c) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1<sup>o</sup> e 3<sup>o</sup> intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

### 5.2.2.3. Parâmetro glicêmico

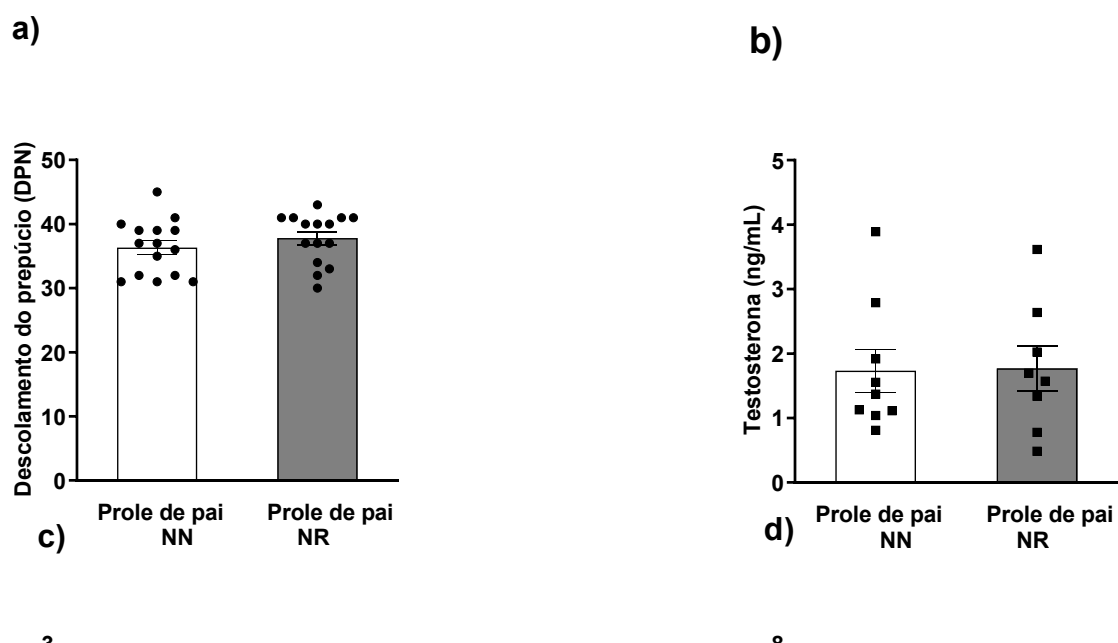
Ao analisar o perfil glicêmico, houve interação entre o fator minutos e grupos [ $F(4, 84) = 6,242, p=0,0002$ ] na glicemia após a sobrecarga de glicose, onde machos adultos filhos de pai de ninhada reduzida apresentaram um maior pico ( $p<0,01$ ) glicêmico após 15 min de sobrecarga de glicose, quando comparados aos filhos de pai de ninhada normal (Fig. 22a). Porém, não houve diferença significativa entre os grupos na área sob a curva no teste de tolerância à glicose [ $t(22) = 0,8822, p = 0,3872$ ] (Fig. 22b). Por fim, não houve diferença entre o grupo controle e o grupo experimental na concentração de glicose [ $U = 70,5, p = 0,7368$ ] (Fig. 22c), mas a prole masculina de pai com supernutrição neonatal apresentou menor índice TyG quando comparado à prole de pai de ninhada normal [ $t(24) = 2.376, p = 0.0258$ ] (Fig. 22d).



**Fig. 22.** Glicemia durante o Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) (a), área sob a curva (ASC) do GTT de 0 a 120 min (mg/dL) (b), glicose (mg/dL) (c) e Índice TyG (d) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM ou mediana e 1º e 3º intervalos interquartis. \* $p < 0,05$ .

#### 5.2.2.4. Parâmetros reprodutivos

Por fim, não houve diferença significativa entre os grupos no descolamento do prepúcio [ $t(28) = 0,9765$ ,  $p = 0,3372$ ] (Fig. 23a), e na concentração de testosterona entre os grupos [ $t(15) = 0,0692$ ,  $p = 0,9457$ ] (Fig. 23b), bem como na concentração de LH [ $t(10) = 0,0435$ ,  $p = 0,9661$ ] (Fig. 23c) e FSH [ $t(14) = 0,8958$ ,  $p = 0,3855$ ] (Fig. 23d).



**Fig. 23.** Descolamento do prepúcio (dias) (a), testosterona (ng/mL) (b), LH (UI/L) (c) e FSH (UI/L) (d) de proles masculinas adultas de pais de ninhada normal (PNN) e reduzida (PNR). Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$

## 6. DISCUSSÃO

Dados do Ministério da Saúde do Brasil (2022) apontam que 3,1 milhões de crianças menores de 10 anos no Brasil apresentam quadro de obesidade. A doença afeta 13,2% das crianças entre 5 e 9 anos acompanhadas no Sistema Único de Saúde (SUS), e pode ter consequências ao longo da vida. Nessa faixa etária, 28% das crianças apresentam sobrepeso (IMC > 25) e entre os menores de 5 anos, o índice é de 14,8% de sobrepeso e de 7% já apresentam para obesidade que é uma doença com etiologia multifatorial e sustentada por interações complexas de fatores genéticos, ambientais e psicossociais (Zheng et. al, 2017).

Em humanos a supernutrição precoce tem sido associada com uma maior suscetibilidade a obesidade e desordens metabólicas na infância e na vida adulta. A supernutrição precoce é observada, como por exemplo, na oferta inadequada de leite de fórmula artificial (qualidade e quantidade), situação em que o bebê tem menos controle do volume e da ingestão de energia em comparação com a amamentação (Li, Fein, Grummer-Strawn, 2010).

De acordo com Parra-Vargas e colaboradores (2020), a redução de ninhada em roedores sintetiza a patofisiologia humana. Camundongos e ratos criados em ninhadas reduzidas, ou seja, com até quatro filhotes por matriz, apresentam rápido ganho de peso no período neonatal, na medida em que há menos competição por alimento, e disfunção metabólica de início tardio.

A maioria das evidências na literatura está focada nas complicações metabólicas advindas pela obesidade materna em sua prole, como o aumento do índice da massa corpórea, hiperlipidemia e hiperglicemia (Nicholas et al.2016, Glastras et. al, 2018). Porém, os estudos relativos aos efeitos da obesidade paterna em seus filhos são escassos. O presente estudo é pioneiro ao demonstrar o dimorfismo sexual na prole de macho supernutrido por redução de ninhada, tanto na pré-puberdade quanto na vida adulta, nos perfis metabólicos e reprodutivos.

Da análise desse estudo, denota-se que a superalimentação paterna por lactação teve impactos nos parâmetros metabólicos e reprodutivos de suas proles. Todavia, esses impactos ocorreram de forma distintas entre os sexos uma vez que machos aparentam ser mais sensíveis a efeitos metabólicos enquanto as fêmeas a disfunções no sistema reprodutor.

O dimorfismo sexual também foi demonstrado por Sanchez-Garrido e seu

grupo (2020) em um estudo sobre a programação da puberdade em resposta à desafios nutricionais precoces em que a dieta rica em lipídeos no pós-desmame adiantou o início da puberdade em fêmeas, mas não em machos. Argente-Arizón e colaboradores (2016) demonstrou que machos e fêmeas respondem de forma diferente a diversas situações metabólicas e que tanto a idade quanto o sexo determinam a resposta à supernutrição neonatal, de modo que os resultados do presente estudo corroboram com o que já foi descrito na literatura nesse aspecto.

Os resultados desse estudo também demonstram que o ambiente pós-natal precoce, além de influenciar a homeostase energética na vida adulta, também pode influenciar a prole dos animais submetidos a supernutrição pós-natal por redução de ninhada, independente de insulto direto. Como relatado por Habbout e colaboradores (2013), as consequências desse modelo experimental podem ser de curto e longo prazo que podem levar não só a eventuais modificações do peso corporal, mas também de características metabólicas.

No presente estudo, tanto a prole de machos quanto a prole de fêmeas de pai de ninhada reduzida apresentaram concentrações diminuídas de HDL durante a pré-puberdade, de modo que essa dislipidemia pode ter sido herdada do pai com supernutrição neonatal, tendo em vista que conforme relatado Luo, Xiao e Nuyt (2010) e colaboradores, eventos adversos na infância aumentam o risco de desenvolvimento de síndrome metabólica caracterizada, dentre outros fatores, pelas baixas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL).

Todavia, apenas machos pré-púberes filhos de pai submetidos à superalimentação neonatal apresentaram Índice de Lee reduzido, menor comprimento da tíbia e maior ingestão alimentar, sugerindo que esses animais têm um desbalanço metabólico na pré-puberdade. Ademais, o menor comprimento da tíbia, pode ser um sinal de um fenótipo de déficit de crescimento, isso porque a obesidade adulta impacta negativamente o eixo do hormônio do crescimento (GH) (Sanchez-Garrido et al., 2020), tendo em vista que o GH é considerado o principal regulador do crescimento pós-natal e do desenvolvimento somático (Reynolds et al., 2014; Zhu et al., 2017).

Nesse sentido, em um estudo realizado com ratos, cujo pai foi alimentado com uma dieta rica em lipídeos, observou que a prole masculina apresentou déficit de crescimento até os seis meses de idade, apontando que a obesidade paterna prejudica o crescimento da prole masculina (Lecomte et al., 2017).

As alterações metabólicas induzidas pela supernutrição neonatal paterna

continuam sendo observadas na vida adulta na prole masculina, mas não na prole feminina, ou seja, os machos descendentes de pais supernutridos apresentam maior sensibilidade para alterações metabólicas desde a mais tenra idade que permanecem por toda a vida mesmo quando não expostos a um desafio.

Machos adultos descendentes de pais de ninhada reduzida demonstraram menor ingestão alimentar, menor concentração plasmática de triglicérides e menor índice TyG, que é um preditor da resistência à insulina (Guerrero-Romero et al. 2010). O fato de apesar de apresentar uma ingestão menor de alimentos, mas não apresentar um menor peso corporal pode ser devido à programação metabólica do pai submetido à supernutrição neonatal, uma vez que animais de ninhada reduzida o excesso de ganho de peso precoce durante o período pós-natal leva à reprogramação permanente da termogênese do tecido adiposo marrom (Xiao et al., 2007).

As concentrações plasmáticas reduzidas de triglicérides na vida adulta da prole de machos de pai com supernutrição neonatal pode estar associada com a menor ingestão alimentar do dia pós-natal 25 ao dia pós-natal 90, e o menor índice TyG apresentado por esses animais pode estar diretamente relacionado à menor concentração plasmática de triglicérides, sugerindo que a ingestão alimentar, apesar de não interferir significativamente nos parâmetros biométricos, exerce influência em padrões de metabólicos de machos descendentes de pai de ninhada reduzida.

A mudança de uma resposta hiperfágica na pré-puberdade para um perfil hipofágico até a vida adulta de machos de pai de ninhada reduzida pode ser devido à herança do perfil dos pais supernutridos, uma vez que no desmame ratos de ninhada reduzida tem alterações na expressão de neuropeptídeos envolvidos no controle da ingestão alimentar e mudança nos níveis de metilação do DNA (Schumacher et al., 2021).

A regulação da homeostase pós-prandial da glicose reflete o equilíbrio entre a capacidade de estimular a utilização de glicose e simultaneamente suprimir a produção endógena de glicose, que é determinada pela sensibilidade à insulina, utilização da glicose e secreção da insulina (Kowalski et al. 2014). Na vida adulta, os machos descendentes de pai de ninhada reduzida apresentaram uma leve intolerância à glicose, evidenciada por um pico de glicemia após 15 minutos de sobrecarga de glicose, sugerindo que machos adultos filhos de pai de ninhada reduzida podem ter um início de intolerância à glicose, provavelmente devido à alterações na secreção de insulina, uma vez que o índice TyG, preditor de resistência

à insulina foi reduzido nos animais do grupo experimental.

Pentinat e seu grupo (2010), usando o protocolo de redução de ninhada em camundongos, em uma pesquisa com a prole masculina de machos supernutridos durante a lactação, observou que estes animais desenvolveram intolerância à glicose, e que este comprometimento estava associado sobretudo à resistência à insulina periférica e não ao comprometimento das células-beta, uma vez que a liberação de insulina foi aumentada nesta prole de pais com obesidade neonatal. As discrepâncias nos achados do presente estudo e no de Pentinat et al. (2010) podem ser devidas às diferenças nas espécies de animais utilizados nos estudos, aqui ratos e naquele estudo camundongos.

Cropley e colaboradores (2016), usando camundongos derivados de uma forma isogênica do camundongo C57BL/6, reportou que o fenótipo dos machos obesos apresentou falhas no metabolismo da glicose e de lipídeos, mas apenas após um desafio dietético após o desmame. Portanto, a obesidade paterna pode predispor sua prole ao quadro de síndrome metabólica latente, que pode ser evidenciada se a prole for exposta a um desafio nutricional ou em um período posterior ao que foi investigado nessa pesquisa.

Neste estudo, as fêmeas não demonstraram alterações metabólicas significativas, nesse sentido Stopa e colaboradores (2019) demonstraram que ratos machos são mais suscetíveis aos efeitos anabólicos de glicocorticoides do que fêmeas, e Hong e colaboradores (2009) demonstraram que camundongos machos são mais suscetíveis a desenvolver obesidade do que fêmeas em resposta à uma dieta hiperlipídica.

A prole de fêmeas de pai com supernutrição neonatal apresentou disfunções no sistema reprodutor no desenvolvimento e na vida adulta. Essas disfunções são típicas do modelo de supernutrição neonatal, pois alterações precoces no ambiente nutricional podem causar efeitos deletérios duradouros no controle do sistema reprodutor ao longo da vida em conjunto com perturbações funcionais (Habbout et al., 2013).

O presente estudo demonstrou que filhas de pai de ninhada reduzida apresentam disfunções reprodutivas da puberdade à vida adulta, como se observa pelo início da puberdade tardia, desregulação do ciclo estral e concentração elevada de estradiol.

Nesse contexto, as filhas de pai de ninhada reduzida apresentaram início tardio

da puberdade, evidenciado pelo número de dias necessários para a abertura vaginal, mas sem mudanças no primeiro estro, marcadores do início da puberdade. Insta salientar que apesar, de o período da abertura vaginal coincidir com a primeira ovulação seguida pelo primeiro estro, esses eventos podem ser dissociados se houver uma mudança nas concentrações de estradiol, que pode ser suficiente para a maturação do epitélio vaginal, mas não suficiente para promover os picos de gonadotropinas necessários para ovulação (Rivest, 1991).

Deste modo, o atraso na abertura vaginal, sem mudanças no primeiro estro, sugere alterações nas concentrações de estradiol e maturação tardia do eixo hipotálamo-hipófise-ovário nas fêmeas descendentes de pai com supernutrição neonatal e que a obesidade precoce do pai de ninhada reduzida pode afetar o sistema endócrino, modificando o tempo da puberdade.

O ciclo estral pode ser dividido em regular ou irregular, sendo que um ciclo regular é definido como um ciclo de 4 ou 5 dias, em que o proestro dura cerca de 12 a 14 horas, o estro dura em torno de 25 a 27 horas, o diestro I tem cerca de 6 a 8 horas, e o diestro II tem duração de 55 a 57 horas. O aumento da concentração de estradiol começa no segundo dia do diestro e tem seu pico por volta do meio dia do proestro e o comportamento sexual receptivo da fêmea geralmente é observado em um período de tempo começando na tarde do proestro até manhã do estro, sendo que a presença de um ciclo estral regular não indica necessariamente que houve ovulação (Goldman, Murr e Cooper, 2007).

Assim, a ocorrência do coeficiente de diestro I e II aumentados e o coeficiente de estro reduzido exibido durante o ciclo estral das fêmeas filhas de pai de ninhada reduzida na vida adulta, sugere uma maior predominância de períodos inférteis do que períodos férteis nestas ratas. Além disso, as fêmeas descendentes de pai submetido à supernutrição neonatal apresentaram uma concentração significativamente maior de estradiol, sugerindo uma possível disfunção ovariana, como por exemplo, a síndrome do ovário policístico.

As fêmeas de pai de ninhada reduzida apresentaram também o peso das adrenais aumentado, característica que foi exibida por machos submetidos a supernutrição pós-natal, conforme relatado por Boullu-Ciocca e colaboradores (2005). Além disso, a literatura tem reportado que adaptações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) tem efeitos nas respostas de estresse; no eixo hipotálamo-pituitária-tireoide, impactando o gasto energia; e no eixo reprodutivo causando desordens

reprodutivas (Souza, Moura e Lisboa, 2022).

Juntos, esses achados demonstram a importância dos mecanismos envolvidos no fenótipo de supernutrição pós-natal e os seus efeitos até a vida adulta, chegando à primeira geração de descendentes.

## **7. CONCLUSÃO**

Este estudo demonstra que as fêmeas de pai com supernutrição neonatal apresentaram atraso na instalação da puberdade e maior prevalência de períodos de infertilidade no ciclo estral (diestro I e II e menor coeficiente de estro), indicando uma potencial suscetibilidade a problemas reprodutivos, enquanto os machos de pai com supernutrição neonatal apresentam sinais de disfunções metabólicas e suscetibilidade a síndrome metabólica. De forma conjunta esse trabalho é pioneiro em demonstrar que a obesidade paterna por supernutrição neonatal impacta os descendentes de uma maneira relacionada ao sexo.

## REFERÊNCIAS

- ANSELMO-FRANCI, SZAWKA. Controle Neuroendócrino da Reprodução Feminina. In: Antunes-Rodrigues J; Cols. (Org.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro, Guanabara Kooganm 2005.p. 321-322. ISBN 8527709791
- ARGENTE-ARIZÓN, P. et al. Age and sex dependent effects of early overnutrition on metabolic parameters and the role of neonatal androgens. **Biology of Sex Differences**, v. 7, n. 1, 18 maio 2016.
- BARELLA, L. F. et al. Early exposure to a high-fat diet has more drastic consequences on metabolism compared with exposure during adulthood in rats. **Hormone and metabolic research**, v. 44, n. 6, p. 458–464, 2012.
- BATRA, V. et al. Parental programming of offspring health: The intricate interplay between diet, environment, reproduction and development. **Biomolecules**, v. 12, n. 9, p. 1289, 2022.
- 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, abr. 1968.
- BILLAH, M. M. et al. Effects of paternal overnutrition and interventions on future generations. **International Journal of Obesity**, 12 jan. 2022.
- BOULLU-CIOCCA, S. et al. Postnatal Diet-Induced Obesity in Rats Upregulates Systemic and Adipose Tissue Glucocorticoid Metabolism During Development and in Adulthood. **Diabetes**, v. 54, n. 1, p. 197–203, 1 jan. 2005.
- COMAS-ARMANGUE, G. et al. The legacy of parental obesity: Mechanisms of non-genetic transmission and reversibility. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. 2461, 2022.
- CROPLEY, J. E. et al. Male-lineage transmission of an acquired metabolic phenotype induced by grand-paternal obesity. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 8, p. 699–708, ago. 2016.
- DAY, J. et al. Influence of paternal preconception exposures on their offspring: through epigenetics to phenotype. **American journal of stem cells**, v. 5, n. 1, p. 11–18, 2016.
- DOS SANTOS, A. H. et al. In utero and lactational exposure to fluoxetine delays puberty onset in female rats offspring. **Reproductive Toxicology**, v. 62, p. 1–8, jul. 2016.
- EILAND, L.; ROMEO, R. D. Stress and the developing adolescent brain. **Neuroscience**, v. 249, p. 162–171, 2013.
- FERREIRA, L. A. et al. Maternal postnatal early overfeeding induces sex-related cardiac dysfunction and alters sexually hormones levels in young offspring. The

Journal of nutritional biochemistry, v. 103, n. 108969, p. 108969, 2022.

FLEMING, T. P. et al. Origins of lifetime health around the time of conception: causes and consequences. **Lancet**, v. 391, n. 10132, p. 1842–1852, 2018.

GARCÍA-VARGAS, D. et al. Prenatal stress decreases sperm quality, mature follicles and fertility in rats. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 65, n. 3, p. 223–235, 28 jan. 2019.

GAYTAN, F. et al. Balano-preputial separation as an external sign of puberty in the rat: correlation with histologic testicular data. **Andrologia**, v. 20, n. 5, p. 450–453, 1988.

GLASTRAS, SARAH J. et al. Maternal obesity increases the risk of metabolic disease and impacts renal health in offspring. **Bioscience Reports**, v. 38, n. 2, 29 mar. 2018.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A.; BUKLIJAS, T. A conceptual framework for the developmental origins of health and disease. **Journal of developmental origins of health and disease**, v. 1, n. 1, p. 6–18, 2010.

GOLDMAN, J. M.; MURR, A. S.; COOPER, R. L. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. Birth defects research. Part B, **Developmental and reproductive toxicology**, v. 80, n. 2, p. 84–97, 2007.

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**, v. 95, n. 7, p. 3347–3351, 1 jul. 2010.

HABBOU, A. et al. 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.

HERBISON, A. E. Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing 773 hormone neurons. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 8, p. 452–466, 2016.

HONG, J. et al. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutrition Journal**, v. 8, n. 1, 17 fev. 2009.

KOWALSKI, G. M.; BRUCE, C. R. The regulation of glucose metabolism: implications and considerations for the assessment of glucose homeostasis in rodents. **American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism**, v. 307, n. 10, p. E859–871, 15 nov. 2014.

LECOMTE, V. et al. Effects of paternal obesity on growth and adiposity of male rat offspring. **American Journal of Physiology-endocrinology and Metabolism**, v. 312, n. 2, p. E117–E125, 1 fev. 2017.

LIVADAS, S.; CHROUSOS, G. P. Control of the onset of puberty. **Current opinion in pediatrics**, v. 28, n. 4, p. 551–558, 2016.

LUO, Z.-C.; XIAO, L.; NUYT, A.-M. Mechanisms of developmental programming of the metabolic syndrome and related disorders. **World journal of diabetes**, v. 1, n. 3, p. 89–98, 2010.

NICHOLAS, L. M. et al. The early origins of obesity and insulin resistance: timing, programming and mechanisms. **International Journal of Obesity**, v. 40, n. 2, p. 229–238, 14 set. 2015.

**Obesity and overweight.** Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>>. Acesso em: 25 set. 2023.

**Obesity atlas 2023.** Disponível em: <<https://data.worldobesity.org/publications/?cat=19>>. Acesso em: 25 set. 2023.

PARRA-VARGAS, M. et al. The long-lasting shadow of litter size in rodents: litter size is an underreported variable that strongly determines adult physiology. **Molecular metabolism**, v. 71, n. 101707, p. 101707, 2023.

PENTINAT, T. et al. Transgenerational inheritance of glucose intolerance in a mouse model of neonatal overnutrition. **Endocrinology**, v. 151, n. 12, p. 5617–5623, 2010.

PLANT, T. M. 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-pituitary–gonadal axis. **The journal of endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T41–T54, 2015.

RAAD, G. et al. Adverse effects of paternal obesity on the motile spermatozoa quality. **PloS one**, v. 14, n. 2, p. e0211837, 2019.

RIVEST, R. W. Sexual maturation in female rats: Hereditary, developmental and environmental aspects. **Experientia**, v. 47, n. 10, p. 1026–1038, out. 1991.

SANCHEZ-GARRIDO, M. A. et al. Early overnutrition sensitizes the growth hormone axis to the impact of diet-induced obesity via sex-divergent mechanisms. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 17 ago. 2020.

SCHUMACHER, R. et al. Temporary effects of neonatal overfeeding on homeostatic control of food intake involve alterations in POMC promoter methylation in male rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 522, p. 111123, fev. 2021.

SHARP, P. E.; VILLANO, J. S. **The laboratory rat, second edition.** 2. ed. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 2011.

SILVEIRA, P. P. et al. Origens desenvolvimentistas da saúde e da doença (DOHaD). **Jornal de pediatria**, v. 83, n. 6, 2007.

SOUBRY, A. POHaD: why we should study future fathers. **Environmental epigenetics**, v. 4, n. 2, 2018.

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**, v. 14, n. 10, p. 2045, 2022.

STOPA, L. R. S. et al. Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. **Physiology & Behavior**, v. 209, p. 112587, 1 out. 2019.

STOPA, L. R. S. et al. Neonatal overfeeding reduces estradiol plasma levels and disrupts noradrenergic-kisspeptin-GnRH pathway and fertility in adult female rats. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 524, p. 111147, 15 mar. 2021.

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, 1 abr. 2023.

XIAO, X. Q. et al. Excess Weight Gain during the Early Postnatal Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive Thermogenesis. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4150–4159, 1 set. 2007.

ZHENG, M. et al. Rapid weight gain during infancy and subsequent adiposity: a systematic review and meta-analysis of evidence. **Obesity reviews: an official journal of the International Association for the Study of Obesity**, v. 19, n. 3, p. 321–332, 2017

**ANEXO A**

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**
**OF. CIRC. CEUA Nº 164/2019**

Londrina, 25 de novembro de 2019.

**Prezado (a) professor (a),**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: "**Alterações nutricionais pós-natais por manipulação do tamanho da ninhada em ratos: efeitos da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na homeostase energética em machos e avaliação de parâmetros metabólicos e reprodutivos em fêmeas e suas proles.**" protocolo CEUA nº 18310.2019.03 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 **25/11/2019**.

Este projeto tem por objetivo investigar o papel da colecistocinina e do lipopolissacarídeo na homeostase energética de ratos machos Wistar submetidos a alterações nutricionais no período pós-natal por redução ou por expansão da ninhada, bem como avaliar os efeitos da expansão da ninhada no desenvolvimento sexual, metabólico e reprodutivo de fêmeas. **Grau de invasividade: 3.**

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	01/01/2020 a 31/12/2022
Espécie/ linhagem/ raça	Rato heterogênico
Nº de animais	1732, sendo 876 Machos e 856 Fêmeas
Peso/ Idade	Matrizes: 146 Machos e 126 Fêmeas (Biotério Central) Prole estimada: 730 Machos e 730 Fêmeas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central da UEL
Amostras a serem coletadas	Sangue, cérebro, testículos, ovários, glândulas adrenais e tecido adiposo

Cumpra 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.

**Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão, conforme vigência expressa neste ofício, encaminhar relatório da descrição de uso de animais para [ceua@uel.br](mailto:ceua@uel.br), conforme modelo disponível no site da CEUA/UEL (<http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>).**

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 do Comitê de  
 Ética no Uso de Animais  
 Universidade Estadual de Londrina  
 ceua@uel.br / (41) 3371-5454

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