



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RHAUANY PELISSON GUERGOLETTE

**DIMORFISMO SEXUAL DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
REPRODUTIVOS DE PROLES (F2) DE RATAS SUBNUTRIDAS POR
EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Londrina
2022

RHAUANY PELISSON GUERGOLETTE

**DIMORFISMO SEXUAL DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
REPRODUTIVOS DE PROLES (F2) DE RATAS SUBNUTRIDAS POR
EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa.

Londrina
2022

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

G931d Guergolette, Rhauany Pelisson.
Dimorfismo sexual nos parâmetros metabólicos e reprodutivos de proles (F2) de ratas subnutridas por expansão do tamanho da ninhada / Rhauany Pelisson Guergolette. - Londrina, 2022.
42 f. : il.

Orientador: Ernane Torres Uchôa.
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2022.
Inclui bibliografia.

1. subnutrição lactacional - Tese. 2. ninhada expandida - Tese. 3. pré-concepção - Tese. 4. desenvolvimento da prole - 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

RHAUANY PELISSON GUERGOLETTE

**DIMORFISMO SEXUAL DOS PARÂMETROS METABÓLICOS E
REPRODUTIVOS DE PROLES (F2) DE RATAS SUBNUTRIDAS POR
EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Graziela S. Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Sabrina Grassioli
Universidade Estadual do Oeste do Paraná –
UNIOESTE

Londrina, 23 de agosto de 2022.

Dedico este trabalho à
minha família, por todo
apoio, amor e
dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar ao meu lado me guiando e discernindo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus pais, meu alicerce, por todo incentivo e suporte que me proporcionaram para que eu realizasse esse sonho. Obrigada por todo amor que depositaram a me criar, devo a vocês grande parte do que sou hoje.

Aos meus irmãos, que estiveram ao meu lado em todos os processos da minha vida até aqui. Obrigada por apoiarem as minhas decisões e por todo apoio.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa, por ter aceitado me orientar durante esses anos, guardo em meu coração todos os ensinamentos e conselhos. Agradeço por ser esse exemplo ímpar de profissionalismo e dedicação.

Ao meu namorado, Evandro, por toda paciência e companheirismo. Agradeço por todos os fins de semana passados na UEL e por sempre apoiar, torcer e vibrar pelo meu sucesso profissional.

A minha melhor amiga, sócia e companheira de laboratório, Larissa, por estar ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus colegas de laboratório e departamento, Camila, Andressa, Ana Luiza, Danielly, Cleusa, Polyana, Lucas e Fabiano, vocês para mim são sinônimo de resiliência e companheirismo para mim.

Aos funcionários do departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, agradeço por todo suporte técnico para a realização deste trabalho.

Aos demais professores do Programa (PGCIF - UEL), vocês são cientistas extraordinários e exemplo de competência, agradeço a oportunidade de aprender e evoluir profissionalmente com cada um de vocês durante essa experiência acadêmica.

GUERGOLETTE, Rhauany Pelisson. **Dimorfismo sexual nos parâmetros metabólicos e reprodutivos de proles (F2) de ratas subnutridas por expansão do tamanho da ninhada**. 2022. 42 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

RESUMO

Os estudos das Origens desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHAD) abordam métodos de estudo e pesquisa, diferentes perspectivas, conceitos e aspectos éticos para essa área do conhecimento, e a expansão do tamanho da ninhada é um modelo DOHAD utilizado para estudar a subnutrição no período lactacional e seus possíveis efeitos na vida adulta e das futuras gerações. O modelo experimental utilizado neste estudo consistiu em ratas Wistar provenientes de ninhada normal (*normal litter* - 10 filhotes) e ninhada expandida (*large litter* - 16 filhotes). Fêmeas LL (F1) possuíram menor disponibilidade ao leite materno, considerando a maior competição entre os filhotes para o aleitamento e, conseqüentemente, foi gerada subnutrição nestas ratas. Após o desmame, foi oferecida dieta nutricional adequada e *ad libitum* até o fim do protocolo. O presente estudo avaliou as possíveis alterações metabólicas e reprodutivas na prole masculina e feminina F2 de F1 (fêmeas) submetidas à subnutrição pós-natal induzida pela expansão do tamanho da ninhada, onde os pais (machos) não passaram por manipulação de ninhada. Para isso, foram avaliados parâmetros metabólicos e reprodutivos das proles dessas fêmeas LL. As proles receberam acesso considerado normal ao leite materno e, após o desmame, dieta nutricional padrão e *ad libitum* até o DPN 90. Os resultados mostraram que as proles masculina e feminina de mães LL apresentaram maior ingestão alimentar. A prole masculina de fêmeas subnutridas apresentou peso corporal reduzido desde a lactação até a idade adulta, distância nasoanal reduzida na infância e aumentada na vida adulta, índice de Lee diminuído na idade adulta, e a prole feminina apresentou distância nasoanal diminuída na infância e *catch-up* na idade adulta. A prole masculina de mães LL apresentou maior insulinemia e tolerância à glicose, concentrações plasmáticas de triacilglicerol reduzidas, sem alterações na prole feminina. Estes dados indicam que a subnutrição neonatal em fêmeas predispõe sua prole masculina e feminina a desenvolver alterações metabólicas, mas não reprodutivas. A prole masculina é mais suscetível a alterações metabólicas do que a feminina. Assim, há um dimorfismo sexual nas respostas metabólicas de proles oriundas de mães com subnutrição pré-concepcional.

Palavras-chave: subnutrição lactacional; ninhada expandida; pré-concepção; desenvolvimento da prole; homeostase energética.

GUERGOLETTE, Rhauany Pelisson. **Sexual dimorphism on metabolic and reproductive parameters of offspring (F2) of malnourished female rats by litter size expansion**. 2022. 42 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2022.

ABSTRACT

The Developmental Origins of Health and Disease (DOHAD) studies address research methods, different perspectives, concepts and ethical aspects for this area of knowledge, and litter size expansion is a DOHAD model used to study malnourished in the lactational period and its possible effects on adulthood and future generations. The experimental model used in this study consisted of female Wistar rats from normal litter (10 pups) and large (16 pups). LL females (F1) had lower availability to breast milk, considering the greater competition between the offspring for suckling and, consequently, malnourish was generated in these rats. After weaning, an adequate nutritional diet was offered ad libitum until the end of the protocol. The present study evaluated the possible metabolic and reproductive changes in male and female offspring F2 of F1 (females) that were subjected to postnatal malnourish induced by litter size expansion, where the fathers (males) did not undergo litter size manipulation. For this, metabolic and reproductive parameters of the offspring were evaluated. The offspring received normal access to breast milk and, after weaning, standard nutritional and ad libitum feeding until DPN 90. The results showed that the male and female offspring of LL mothers had higher food intake than offspring of NL mothers. The male offspring of malnourished females showed reduced body weight from lactation to adulthood, reduced nasoanal distance in childhood, increased nasoanal distance and decreased Lee index in adulthood. Female offspring showed decreased nasoanal distance in childhood, and also presented *catch-up* in adulthood. Male offspring of LL mothers showed higher insulinemia and glucose tolerance, and reduced plasma concentrations of triacylglycerol, with no changes in the female offspring. Taken together, these results indicate that neonatal malnourish in females predisposes their male and female offspring to develop metabolic alterations, without reproductive repercussions, and male offspring seem to be more susceptible to present metabolic alterations than female offspring. Thus, there is a sexual dimorphism in the metabolic responses of offspring from mothers with preconceptional malnourish.

Key words: lactation undernutrition; expanded litter; preconception; offspring development; energy homeostasis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Protocolo experimental realizado para obtenção da F216
- Figura 2** - Protocolo experimental realizado com a F1 para obtenção da F2 .17
- Figura 3** - Delineamento experimental realizado com a F218
- Figura 4** - Peso corporal - gestação (DG 0 ao DG 20) e lactação (DL 7 ao 17) das ratas (F1); Área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar das ratas (F1) no período lactacional (F2)22
- Figura 5** - Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e a Curva (AUC) do GTT das ratas (F1) no dia gestacional (DG) 14; Concentrações plasmáticas de triacilglicerol, colesterol total e ácidos graxos livres das mães (F1) no dia lactacional (DL) 2123
- Figura 6** - Peso corporal do DPN (dia pós-natal) 4 ao 21 (desmame) e do DPN 21 ao 90 da prole (F2) masculina e feminina de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). Área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar do DPN 21 ao 90 das proles masculina e feminina de ratas (F1) NL e LL; Índice de Lee e distância nasoanal no DPN 21 e 90 das proles masculina e feminina de ratas (F1) NL e LL25
- Figura 7** - Teste de Tolerância à Glicose (GTT) e a área sob a curva (AUC) do GTT da prole masculina e feminina (F2) de ratas (F1) NL e LL27
- Figura 8** - Concentrações plasmáticas de insulina (μ U/mL), colesterol total (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL) e ácidos graxos livres (μ moles/dL) da prole (F2) masculina e feminina de ratas (F1) NL e LL28

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Peso do tecido adiposo perigonadal+perirrenal (g/100g), tecido adiposo retroperitoneal (g/100g), ovários (g/100g) e úteros (g/100g) de ratas (F1) NL (normal litter) e LL (large litter) no dia lactacional (DL) 2122
- Tabela 2** - Peso do tecido adiposo retroperitoneal (TAR) (g/100g) e tecido adiposo perigonadal (TAP) (g/100g) da prole masculina (F2) de mães (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). Peso do tecido adiposo retroperitoneal (TAR) (g/100g) e tecido adiposo perigonadal+perirrenal (TAP) (g/100g) da prole feminina (F2) de mães (F1) NL e LL.....26
- Tabela 3** - Descolamento do prepúcio (DPN), peso dos testículos (g/100g) e concentração plasmática de testosterona (ng/mL) da prole masculina (F2) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida)29
- Tabela 4** - Abertura vaginal (DPN), primeiro estro (DPN), regularização do ciclo (DPN), duração do ciclo (dias), coeficiente proestro (%), coeficiente estro (%), coeficiente diestro (I e II) (%), concentração plasmática de estradiol (ng/mL), peso dos ovários e útero (g/100g) da prole feminina (F2) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida)30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	15
3	OBJETIVOS	15
3.1	OBJETIVO GERAL	15
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	MODELO ANIMAL	16
4.2	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	18
4.3	DETERMINAÇÃO DO CICLO ESTRAL	19
4.4	DETERMINAÇÃO DO DESCOLAMENTO DO PREPÚCIO E ABERTURA VAGINAL	19
4.5	ÍNDICE DE LEE	20
4.6	TESTE DE TOLERÂNCIA À GLICOSE	20
4.7	DOSAGENS PLASMÁTICAS DE COLESTEROL TOTAL, TRIACILGLICEROL, ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, INSULINA, ESTRADIOL E TESTOSTERONA	20
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	21
5	RESULTADOS	21
5.1	EFEITOS DA SUBNUTRIÇÃO PÓS-NATAL INDUZIDA PELA EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA EM RATAS (F1) DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO .	21
5.2	EFEITOS DA SUBNUTRIÇÃO MATERNA PRÉ-CONCEPCIONAL, INDUZIDA NO PERÍODO NEONATAL PELA EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA, NOS PARÂMETROS METABÓLICOS DE SUAS PROLES	24
5.3	EFEITOS DA SUBNUTRIÇÃO MATERNA PRÉ-CONCEPCIONAL, INDUZIDA NO PERÍODO NEONATAL PELA EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA, NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS DE SUAS PROLES MASCULINA E FEMININA	29
6	DISCUSSÃO	31
7	CONCLUSÃO	36

REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	42
ANEXO A - CEUA/UEL.....	42

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2021), a desnutrição é uma condição de caráter multifatorial, visto que a fome em seus diferentes estágios é uma das possíveis consequências da falta de acesso a necessidades básicas do ser humano, não envolvendo apenas a falta de renda ou disponibilidade alimentar, e sim diversos outros fatores. Descrita pelo Ministério da Saúde como uma condição clínica decorrente da deficiência de um ou mais nutrientes essenciais, a subnutrição pode ser consequência de dificuldades financeiras, falta de acesso a alimentos saudáveis, incidência repetida de infecções intestinais causadas pela falta de saneamento básico e até mesmo por desmame precoce. Segundo a Organização das Nações Unidas (ONU, 2019), o número de pessoas desnutridas no mundo é de 821 milhões, sendo mais de 18 milhões mulheres em estado de desnutrição grave (ONU, 2019).

Segundo o relatório realizado pela ONU em 2021, o número de crianças menores de cinco anos com desnutrição crônica no mundo ultrapassou 149 milhões. No Brasil, em nove meses foram registradas mais de três mil mortes de crianças (até os nove anos de idade) por desnutrição (DataSUS, Ministério da Saúde, 2021). O período de pandemia aumentou a insegurança alimentar no Brasil, algo que já era crescente devido à crise econômica e política. Coincidentemente, com o aumento da obesidade neste período houve desnutrição infantil, possivelmente sendo ocasionada pela ingestão inadequada de nutrientes, considerando que o sobrepeso gera o excesso calórico e lipídico, resultando em *déficit* de vitaminas e minerais vitais (ONU, 2021). A desnutrição é tanto o *déficit* de quantidade de alimento, quanto de qualidade alimentar. No segundo caso, já foi visto que o *déficit* de micronutrientes ainda prevalece em adultos e há um alerta especial entre mulheres em idade reprodutiva (BHUTTA et al., 2017). A desnutrição, assim como a supernutrição, durante os períodos de plasticidade do desenvolvimento acarretam uma predisposição a diversas patologias e comorbidades, como a obesidade e hipertensão na idade adulta (VELKOSKA et al., 2008).

Eventos em períodos ou fases de plasticidade do desenvolvimento, como o período pré-gestacional, intrauterino, perinatal, pós-natal e pubertário, podem influenciar o desenvolvimento normal e saudável, impactando de forma direta a saúde da prole precoce e/ou tardiamente. Pesquisas realizadas nessa área tiveram início por meio de observações epidemiológicas feitas por Barker e colaboradores, que associaram o baixo peso ao nascer com maior risco de patologias cardiovasculares na vida adulta (BARKER, 1998), e estão inseridas nos estudos de “Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD)”, de

grande relevância e necessidade para as políticas de agências de saúde pública (FERREIRA et al., 2022; SUZUKI, 2005).

Pesquisas epidemiológicas e em animais apontam que, a longo prazo, a saúde pode ser influenciada por eventos que ocorreram no período lactacional (MCMILLEN et al., 2005). O período lactacional dos roedores é um período considerado importante, no qual o apetite, a pressão arterial e o metabolismo podem ser programados. A lactação é responsável por dar continuidade à nutrição iniciada no período intrauterino, e o leite materno possui diversos impactos além do seu valor nutricional, tendo um papel primordial no desenvolvimento e condição futura de saúde da progênie (NEVILLE, 2012). Considerando que o estado nutricional durante o período inicial da vida é um determinante importante tanto para o desenvolvimento e maturação adequados dos sistemas metabólico e endócrino (PRIOR et al., 2008), distintas pesquisas aplicam a metodologia de ajuste do tamanho da ninhada para estudar os efeitos da nutrição sobre os parâmetros de desenvolvimento. Nas ninhadas expandidas, a prole tem menor disponibilidade de leite, induzindo subnutrição, e o oposto ocorre em ninhadas reduzidas, onde a prole possui uma maior disponibilidade ao leite, ocasionando obesidade (BASSET & CRAIG, 1988; BABICKY et al., 1973, VOLKOSKA et al., 2005). Para isso, as ninhadas expandidas (*large litter*, LL) contém de 16-20 filhotes, enquanto a ninhada normal (*normal litter*, NL) contém de 8-10 filhotes, de modo que os animais de ninhada expandida têm uma menor oferta de leite materno durante os primeiros 21 dias de vida, uma vez que há maior competição entre os filhotes para o aleitamento (PLAGEMANN et al., 1999). Assim, a expansão do tamanho da ninhada é um modelo para estudar paradigmas relacionados ao modelo DOHaD, no qual podem ser estudados os efeitos da subnutrição na lactação e suas consequências na vida adulta e demais gerações (VELKOSKA et al., 2008).

A subnutrição pós-natal causada pela expansão do tamanho da ninhada acarreta diminuição do peso corporal, hipoleptinemia e hipoinsulinemia após o desmame, enquanto o inverso ocorre em ninhadas supernutridas por redução do tamanho da ninhada (VELKOSKA et al., 2008; PLAGEMANN et al., 1999). Além disso, a alteração do tamanho da ninhada está acompanhada de modificações na composição do leite materno, e está envolvida no processo de programação metabólica, ocasionando modificações tanto no tamanho quanto no volume de adipócitos, induzindo assim uma diferenciação metabólica (CANCIAN et al. 2016; MOZEŠ et al., 2014; BALABAN et al., 2004).

Estudos epidemiológicos indicam que a suscetibilidade em humanos adultos à hipertensão e doenças cardiovasculares pode resultar da restrição do crescimento intrauterino e do baixo peso ao nascer induzido pela desnutrição materna (KWONG et. al, 2000). Apesar de inúmeros estudos com indivíduos subnutridos, a subnutrição materna

ainda é uma lacuna importante na condição de saúde pública em países de baixa e média renda. Mulheres com subnutrição possuem algumas alterações preocupantes, como a deficiência de inúmeros micronutrientes, o que acarreta alto risco de desenvolver efeitos indesejados no período gestacional e na prole (BLACK et al., 2010; WORKICHO et al., 2016). O período gestacional é um momento importante para o crescimento e desenvolvimento fetal, no qual o estado nutricional materno influencia diretamente a saúde fetal. Como já dito, o período gestacional possui elevada plasticidade, onde o desenvolvimento fetal pode ser influenciado por fatores ambientais, hormônios maternos, nutrientes, e pelo perfil genético herdado (VICKERS, 2000). Além disso, o embrião pré-implantação possui maior sensibilidade a modificações epigenéticas, podendo ter consequências em sua programação (REIK et al., 1993; DEAN et al., 1998; JIMENEZ-CHILLARON et al, 2009). Nesse contexto, trabalhos realizados em humanos mostraram que alturas próximas do normal podem ser alcançadas em crianças (F2) nascidas de mães (F1) que foram desnutridas na infância, quando profundas melhorias na saúde, nutrição e meio ambiente ocorrem antes da concepção (MARTORELL & ZONGRONE, 2012), evidenciando que o estado pré-concepcional da mãe pode ser determinante para o desenvolvimento e qualidade de vida da progênie.

Um estudo em que a desnutrição materna (F0) foi feita durante a gestação (pós concepção) mostrou aumento considerável no risco de desenvolver doenças metabólicas e obesidade na geração F1 com sensibilidade sexo-específica, sendo a prole feminina menos suscetível em comparação a prole masculina (CISSÉ et. al, 2018). No entanto, quando essas ratas F1 predispostas engravidam, apresentam algumas alterações fisiológicas que podem, por sua vez, criar um ambiente intrauterino adverso para o crescimento da prole F2, contribuindo para a transmissão de doenças através das gerações subsequentes. Tal transmissão de características induzidas pelo ambiente para a geração F2 por meio da linhagem materna (F1) deve ser definida como um efeito multigeracional (CISSÉ et. al, 2018).

Quando avaliados os efeitos intergeracionais da desnutrição materna (F0) no crescimento e perfil metabólico da geração F2 por meio da linhagem materna, o fenótipo restrito ao crescimento mostrou ser transmitido para a segunda geração, apoiando os dados publicados anteriormente em outros modelos de roedores (JIMENEZ-CHILLARON et. al, 2011; GOODSPEED & SEFEROVIC, 2015; HARDIKAR et. al, 2015). Além disso, o metabolismo materno também é capaz de influenciar os fenótipos entre gerações (JIMENEZ-CHILLARON et al, 2009), e o tamanho do útero é reduzido em meninas que nascem pequenas (F1) e permanecem baixas, e isso pode influenciar o crescimento fetal e reduzir o peso da progênie (F2) (BAÑOZ-GOMEZ et al, 2000; JIMENEZ CHILLARON et al,

2009). A restrição de crescimento hereditário está associada à expressão reduzida de H19, gene impresso integralmente ao crescimento e desenvolvimento fetal por meio de modificações epigenéticas (GONZALEZ-RODRIGUEZ et. al, 2016; CISSÉ et. al, 2018). Nas crianças, o crescimento e o desenvolvimento adequados são frequentemente considerados como um marcador preditor de uma boa saúde. Entretanto, um sistema complexo controla o início, a taxa e a cessação do crescimento e, portanto, é um exemplo fenomenal das interações entre genética, epigenética e fatores ambientais, especialmente estresse e nutrição (GAT-YABLONSKI & DE LUCA, 2017).

Há evidências de que os efeitos combinados com variantes como genética, epigenética e fatores ambientais podem ser responsáveis por apenas 50% da variabilidade na altura humana (WOOD et. al, 2014), o restante da variabilidade da altura está relacionado a fatores ambientais, especialmente à nutrição (GAT-YABLONSKI & DE LUCA, 2017). Dessa forma, intervenções nutricionais no período pré-concepção são importantes, considerando que micronutrientes na mãe são imprescindíveis e determinantes para a saúde do recém-nascido, porém as evidências em humanos são escassas (MARTORELL & ZONGRONE, 2012). Nesse contexto, a desnutrição é considerada uma das principais causas de atenuação do crescimento infantil (MARTORELL & ZONGRONE, 2012; GAT-YABLONSKI & DE LUCA, 2017). Uma pesquisa feita sobre as possíveis influências intergeracionais no crescimento infantil e desnutrição demonstrou que são necessárias inúmeras gerações para mitigar os efeitos da desnutrição (MARTORELL & ZONGRONE, 2012). Inclusive, os possíveis mecanismos que explicam os efeitos intergeracionais no crescimento linear não são mutuamente exclusivos, incluindo características genéticas compartilhadas, efeitos epigenéticos, programação de alterações metabólicas e a mecânica de um espaço reduzido para o crescimento da prole (MARTORELL & ZONGRONE, 2012).

Adicionalmente, outro estudo intergeracional demonstrou que o modelo de indução de subnutrição materna (F1) na gestação reduziu o peso da prole (F2) ao nascer, intolerância à glicose e obesidade nas proles de primeira e segunda geração (F2 e F3), apesar da alimentação *ad libitum* durante a gravidez (JIMENEZ-CHILLARON et. al, 2009). Além disso, já foi mencionado na literatura que pode haver uma diferença sexo-específica também nas alterações que a mãe ou o pai (F1) podem passar para a prole, e as diferenças sexuais na transmissão dos fenótipos implicam mecanismos complexos: a herança matrilinear da doença é multifatorial e inclui mecanismos metabólicos, epigenéticos e mitocondriais, e a herança patrilinear se deve principalmente a mecanismos epigenéticos (JIMENEZ-CHILLARON et. al, 2009). Resposta sexo-específica também foi observada no estudo de CISSÉ et. al (2018), onde a geração F2 masculina de matrizes (F0) com desnutrição materna durante a gestação apresentou concentrações plasmáticas de insulina

e triacilglicerol elevadas quando comparados à prole controle, além de resistência à insulina quando comparados com a prole feminina (F2), independentemente da linhagem e da dieta da mãe F1. Em contraste, as concentrações plasmáticas de ácidos graxos não esterificados foram maiores nas fêmeas do que nos machos, independentemente da dieta da fêmea F1 (CISSE et. al, 2018).

Nesse contexto, será que a subnutrição gerada no início da vida (lactação) de mães (F1), mesmo após uma dieta nutricional adequada no resto da vida, repercute efeitos em sua prole feminina e masculina (F2)? Como ainda não estão completamente descritos os possíveis efeitos ocasionados pela subnutrição materna no período lactacional e o que podem causar em sua prole, tanto masculina quanto feminina, o presente trabalho visou esclarecer algumas dessas lacunas incompreendidas na literatura até então.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que: 1) estudos demonstraram que ratas (F1) com subnutrição lactacional induzida pela expansão do tamanho da ninhada apresentam alterações metabólicas e reprodutivas da infância à idade adulta; 2) existe um efeito transgeracional de alterações metabólicas observadas em matrizes, 3) a maioria dos trabalhos avaliaram a prole em modelos de subnutrição materna induzida no período pós-concepcional; torna-se relevante a avaliação de parâmetros metabólicos e reprodutivos da prole (F2) feminina e masculina de ratas (F1) Wistar adultas com subnutrição pré-concepcional, induzida no período neonatal por expansão do tamanho da ninhada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Avaliar parâmetros metabólicos e reprodutivos nas proles (F2) feminina e masculina de ratas (F1) submetidas à subnutrição neonatal induzida pela expansão do tamanho da ninhada.

3.2 Objetivos específicos

1. Avaliar os seguintes parâmetros na prole feminina e masculina (F2) de ratas (F1) provenientes de ninhada normal (NL) e expandida (LL):

a) Parâmetros biométricos: ganho de peso corporal, ingestão alimentar, peso de tecido adiposo branco visceral, ovários, útero e adrenais, Índice de Lee e distância naso-anal;

b) Desenvolvimento sexual: Abertura vaginal, primeiro estro, ciclicidade e concentração

plasmática de estradiol; descolamento do prepúcio e concentração plasmática de testosterona;

c) Tolerância à glicose, pelo teste de tolerância à glicose via intraperitoneal (GTT);

d) Perfil metabólico, pelas concentrações plasmáticas de ácidos graxos livres, triacilglicerol, insulina e colesterol total.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Modelo Animal

Ratas Wistar foram obtidas a partir do acasalamento com machos (geração F0) do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), para gerar a F1. No dia do nascimento, dia pós-natal (DPN) 0, o tamanho da ninhada foi ajustado para 16 filhotes (ninhada expandida, LL, 8 machos e 8 fêmeas), para induzir a subalimentação na lactação, ou 10 filhotes (ninhada normal, NL, 5 machos e 5 fêmeas), o grupo controle. Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. Após o desmame, as fêmeas foram alojadas em grupos de 3 a 4 ratas do mesmo grupo experimental em cada gaiola (NL ou LL). A partir do DPN 90, fêmeas de cada grupo foram pareadas para acasalar com machos sem manipulação prévia, a fim de gerar a F2. No DPN 4 da F2, o tamanho da ninhada foi ajustado para 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas). Os filhotes excedentes foram submetidos à eutanásia por decapitação. Após o desmame, os filhotes foram alojados em grupos de 3-4 ratos do mesmo grupo experimental e do mesmo sexo em cada gaiola (proles de NL ou LL) (Figura 1). Os animais foram mantidos em condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 h) e temperatura (22 ± 2 °C), com água e ração à vontade, exceto as horas de restrição alimentar antecedentes ao teste de tolerância à glicose (GTT) e eutanásia. Todos os experimentos foram realizados no Departamento de Ciências Fisiológicas/UEL. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal para experimentação (protocolo CEUA nº 18310.2019.03, OF. CEUA nº164/2019).

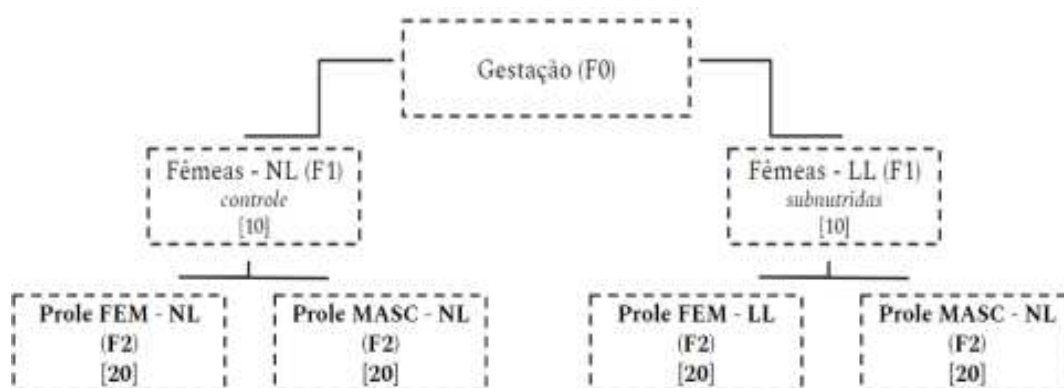


Figura 1. Protocolo experimental realizado para obtenção da F2. NL: normal litter; LL: large litter; Números entre [] abaixo de cada descrição dos grupos: número de animais por grupo.

4.2 Protocolo Experimental

Efeitos da subnutrição materna pré-concepcional, induzida no período neonatal pela expansão do tamanho da ninhada, nos parâmetros metabólicos e reprodutivos de suas proles masculina e feminina (F2).

Para obtenção de F1, no DPN 0, os animais foram agrupados em NL e LL e no DPN 21 ocorreu o desmame. A partir do DPN 90, as fêmeas foram colocadas para acasalar com ratos machos controle e sexualmente experientes. No dia seguinte, quando a gravidez foi constatada, foi considerado o dia gestacional (GD) 0, e cada fêmea foi colocada em uma gaiola individual. No DG (dia gestacional) 14, após privação alimentar de 6 horas, foi realizado Teste Oral de Tolerância à Glicose (oGTT). O dia de nascimento da ninhada foi considerado dia lactacional (DL) 0 e após o desmame dos filhotes, no DL 21, as mães foram submetidas à eutanásia por decapitação, quando o sangue foi coletado para dosagens plasmáticas, e os tecidos adiposos viscerais retroperitoneais e perigonadais foram removidos e pesados (Figura 2).

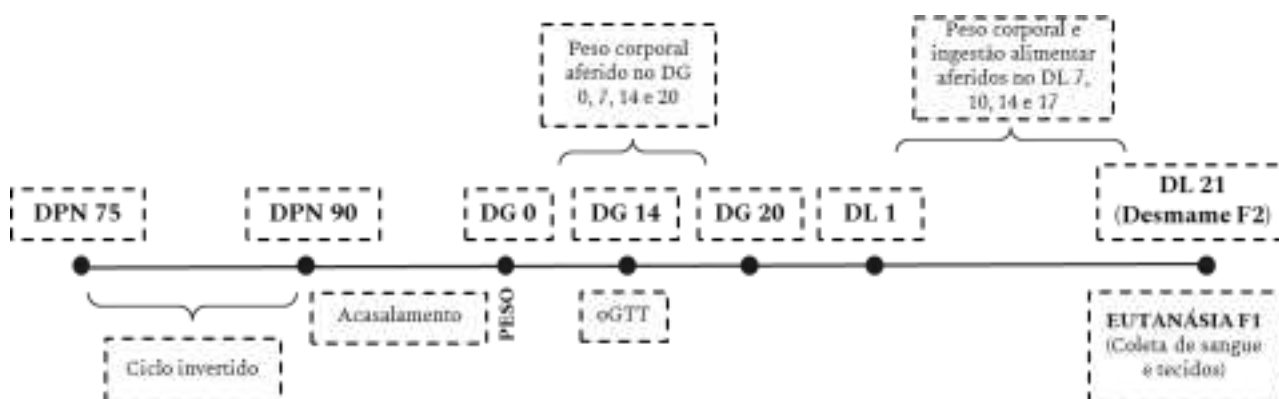


Figura 2. Protocolo experimental realizado com a F1 para obtenção da F2. DG: dia gestacional; DL: dia lactacional; RA: restrição alimentar; oGTT: Teste Oral de Tolerância à Glicose.

No DPN 4 da F2, prole de mães NL ou LL, o ajuste do tamanho da ninhada foi realizado para manter 8 filhotes, 4 machos e 4 fêmeas. Os animais foram pesados a cada 3 dias até o desmame (DPN 21). No DPN 21, os ratos foram pesados e a distância nasoanal foi medida, para posterior cálculo e análise do Índice de Lee (BERNARDIS & PATTERSON, 1968). Após o desmame, os animais foram pesados e a ingestão alimentar avaliada a cada 5 dias até o DPN 90 (Equação 1 e 2).

(Equação 1)

$$\text{INGESTÃO ALIMENTAR MÉDIA (IAM)} = \frac{\text{Ração disponibilizada (g)} - \text{Ração após 5 dias}}{\text{Número de animais na caixa} \times 5 \text{ dias}}$$

(Equação 2)

$$\text{INGESTÃO NORMALIZADA POR g/100g (rato)} = 100 \times \text{IAM} / \text{Peso corporal do animal (última pesagem)}$$

Na prole feminina, a partir do DPN 25, foi analisada a abertura vaginal, onde após a ocorrência da abertura, foram coletados esfregaços vaginais até a ocorrência do primeiro estro e o início da ciclicidade estral (DOS SANTOS et al., 2019). Do DPN 75 ao 90, o peso corporal e a ingestão alimentar foram avaliados diariamente, e novamente os esfregaços vaginais foram coletados para a análise do ciclo estral das fêmeas. No DPN 89, após restrição alimentar de 6 horas, foi realizado GTT via intraperitoneal. A partir do DPN 90, quando em proestro, as ratas foram pesadas e a distância nasoanal aferida, para posterior análise do Índice de Lee, e submetidas à privação alimentar por 6 horas antes da eutanásia por decapitação. Em seguida, ovários, útero, adrenais e tecido adiposo visceral retroperitoneal e perirrenal+perigonadal foram removidos e pesados (Figura 3).

Na prole masculina, a partir do DPN 40, a genitália externa foi observada diariamente até a separação prepucial. No DPN 89, após restrição alimentar de 6 horas, foi realizado GTT. No DPN 90, os ratos foram pesados e a distância nasoanal aferida, para posterior análise do Índice de Lee, e submetidos à restrição alimentar por 6 horas antes da eutanásia por decapitação. Em seguida, os testículos, as adrenais e os tecidos adiposos viscerais retroperitoneais e perigonadais foram removidos e o peso foi aferido (Figura 3).

Após a decapitação, o sangue foi coletado para análise das concentrações plasmáticas de triacilglicerol, colesterol total, ácidos graxos livres, insulina, testosterona e estradiol (Figura 3).

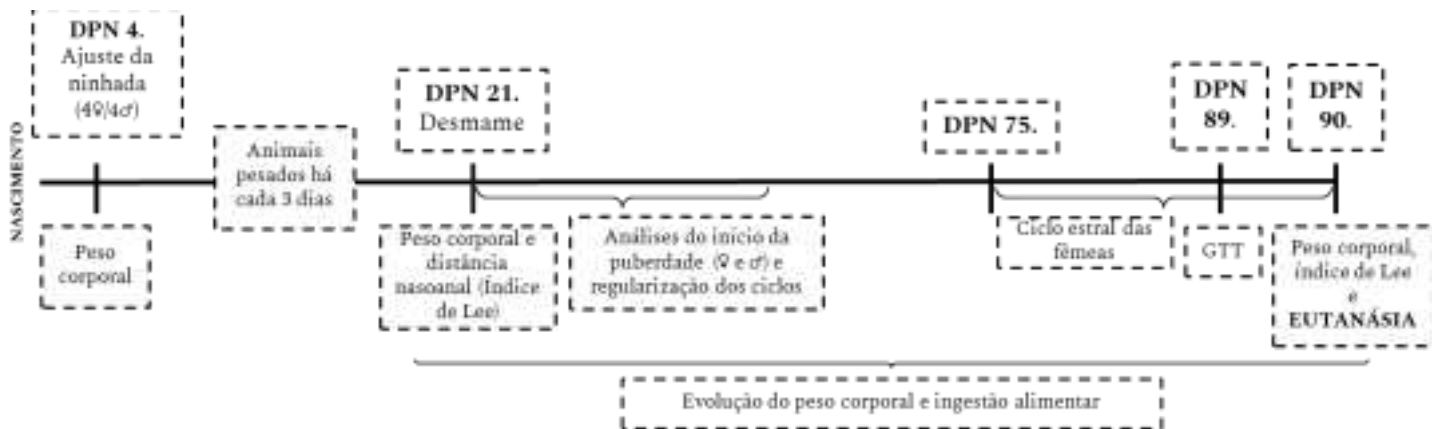


Figura 3. Delineamento experimental realizado com a F2. GTT: Teste de Tolerância à Glicose, neste caso foi realizado via intraperitoneal.

4.3 Determinação do ciclo estral

Esfregaços vaginais foram coletados diariamente às 8 horas para avaliar as fases do ciclo estral. O esfregaço vaginal foi coletado e colocado em lâmina histológica, que foi analisada em microscópio de luz, com aumento de 10x para análise das proporções e tipos celulares (STOPA et al., 2019). Foi calculado o coeficiente de ocorrência (%) de cada fase do ciclo. A eutanásia foi realizada às 14 horas na primeira ocorrência de proestro após DPN 90, para avaliação dos parâmetros durante o feedback positivo induzido por esteroides ovarianos. Após o primeiro estro, a avaliação foi mantida até que fosse regularizada duas vezes consecutivas, quando foi considerado o início da ciclicidade (STOPA et. al, 2021).

4.4 Determinação do descolamento do prepúcio e abertura vaginal

A avaliação do descolamento do prepúcio é um parâmetro de desenvolvimento reprodutivo para ratos machos e início da puberdade. A partir do DPN 40, a genitália externa foi observada diariamente até a observação do descolamento do prepúcio (GAYTAN et al., 1988). E um parâmetro de desenvolvimento reprodutivo e início da puberdade para as fêmeas é a abertura vaginal. A partir do DPN 25, a parte externa da genitália foi observada diariamente até a completa abertura vaginal. Quando a abertura vaginal foi detectada, o esfregaço vaginal foi realizado até a ocorrência do primeiro estro, caracterizado pela predominância de células epiteliais cornificadas (DOS SANTOS et al., 2019), confirmando o início da puberdade.

4.5 Índice de Lee

Tal como o índice de massa corporal (IMC) em humanos, o índice de Lee é considerado um preditor de obesidade rapidamente obtido em ratos. Nos DPN 21 e 90 (para machos, e quando ocorreu o primeiro proestro após o DPN 90 em fêmeas), o índice de Lee foi calculado dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em gramas pelo comprimento naso-anal em centímetros (BERNARDIS & PATTERSON, 1968).

$$\text{ÍNDICE DE LEE: } \left(\frac{\sqrt[3]{\text{Peso corporal do animal (g)}}}{\text{Comprimento naso-anal (cm)}} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

4.6 Teste de tolerância à glicose (GTT)

No dia gestacional (DG) 14 das ratas (F1), após restrição alimentar de 6 horas, foi realizado o oGTT. Foi coletada uma gota de sangue da cauda para determinação da glicemia por meio da fita teste do aparelho Accu-Check (Roche, Taquara, RJ, Brasil). Imediatamente após, foi realizada a administração via gavagem de glicose 25% na dose de 1,0 g/kg de peso corporal do animal. A glicemia também foi aferida após 15, 30, 60 e 120 minutos. Nas proles feminina e masculina (F2), no DPN 89, foi feito o Teste de Tolerância à Glicose (GTT). Após restrição alimentar de 6 horas, foi coletada uma gota de sangue da cauda para determinação da glicemia basal utilizando a tira teste Accu-Check Advantage II (Roche, Taquara, RJ, Brasil) e um aparelho para determinação da glicemia. Após a administração intraperitoneal de glicose (1,0 g/kg de peso corporal) na concentração de 25%, as medições de glicose no sangue foram feitas a partir da tira de teste 15, 30, 60 e 120 min após a sobrecarga de glicose. Após 120 minutos, os animais retornaram às suas gaiolas com alimentos e líquidos *ad libitum* (FERREIRA et al., 2022).

4.7 Dosagens plasmáticas de colesterol total, triacilglicerol, ácidos graxos livres, insulina, estradiol e testosterona.

Após a eutanásia por decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados, submetido à centrifugação a 2500 rpm e 4 °C por 20 min, e o plasma foi armazenado a -20°C, para posterior dosagem de colesterol total, triacilglicerol, ácidos graxos livres, insulina, estradiol e testosterona. A espectrofotometria foi utilizada para a determinação das concentrações plasmáticas de triacilglicerol (742062, HDL COLESTEROL DIRETO - 60 mL/20mL – kit comercial, Laborclin, PR) e colesterol total (743191 - TRIGLICERIDES – BIOLIQUID – KIT 2X100mL, kit comercial, Laborclin, PR). A concentração de ácidos graxos livres (FFA) foi determinada usando um método espectrofotométrico descrito (MIRANDA et al., 2022).

Ensaio imunoenzimático foram realizados para determinação de estradiol (DRG® Estradiol ELISA; The analytical sensitivity: 9.714 pg/mL), testosterona (DRG® Testosterone ELISA; The analytical sensitivity: 0.083 ng/mL) e insulina (Intra-Assay-Reproducibility: CV < 10%; Inter-Assay Reproducibility: CV < 12%). Os níveis mínimo e máximo de detecção foram 25 e 2000 pg/mL para estradiol, 0,2 e 16 ng/mL para testosterona, e 4.69 e 300 µIU/mL para insulina, conforme instruções do fabricante.

4.8 Análise estatística

A análise exploratória foi realizada para avaliar a distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) de cada variável. As variáveis apresentaram distribuição normal e homogeneidade e foram analisadas pelo teste t de Student ou ANOVA para medidas repetidas (RM ANOVA), e os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeitos da subnutrição pós-natal induzida pela expansão do tamanho da ninhada em ratas (F1) durante a gestação e lactação.

Segundo a análise ANOVA de medidas repetidas, não houve interação entre dias gestacionais (DG 0 - 20) e grupos (NL e LL) no peso corporal ($F_{3, 39} = 0,8034$, $p = 0,4996$), com efeito dos dias gestacionais ($F_{3, 39} = 624,1$, $p < 0,0001$) e nos grupos ($F_{1, 13} = 8,164$, $p = 0,0135$) (Figura 4A). A ANOVA de medidas repetidas também evidenciou que não houve interação entre os dias lactacionais 7 e 17 (DL 7 - 17) e grupos (NL e LL) no peso corporal ($F_{3, 45} = 0,1781$, $p = 0,9107$), com efeito dos dias lactacionais ($F_{3, 45} = 5,61$, $p = 0,0024$) e grupo ($F_{1, 15} = 6,914$, $p = 0,019$) (Figura 4A). Na lactação, as ratas provenientes de ninhada expandida (LL) apresentaram hiperfagia [$t(15) = 511$, $p = 0,0240$] (Figura 4B).

Em relação ao oGTT na gestação, não houve interação entre o tempo após a sobrecarga de glicose (0 a 120 min) e os grupos (NL e LL) na glicemia ($F_{4,72} = 0,786$, $p = 0,538$), com efeitos de tempo ($F_{4,72} = 64,75$, $p < 0,0001$), mas sem efeito do grupo ($F_{1,18} = 2,506$, $p = 0,1308$) (Figura 5A). Além disso, não houve diferença entre os grupos na área sob a curva do oGTT [$t(18) = 0,6809$, $p = 0,5046$] (Figura 5B). Quanto às dosagens plasmáticas, não houve diferença entre os grupos na concentração plasmática de triacilglicerol [$t(16) = 1,222$, $p = 0,2394$] e ácidos graxos livres [$t(15) = 0,9760$, $p = 0,3446$], porém as ratas LL apresentaram menor concentração plasmática de colesterol total que as fêmeas NL [$t(21) = 2,329$, $p = 0,0299$]. Também não houve diferença entre os grupos de mães F1 no peso dos ovários [$t(18) = 0,6325$, $p = 0,5350$] e útero [$t(18) = 0,3901$, $p = 0,7010$], e no peso dos tecidos adiposos retroperitoneal [$t(17) = 1,975$, $p = 0,0647$] e perigonadal+perirrenal

[t(18)=1,174, p=0,2557] (Tabela 1).

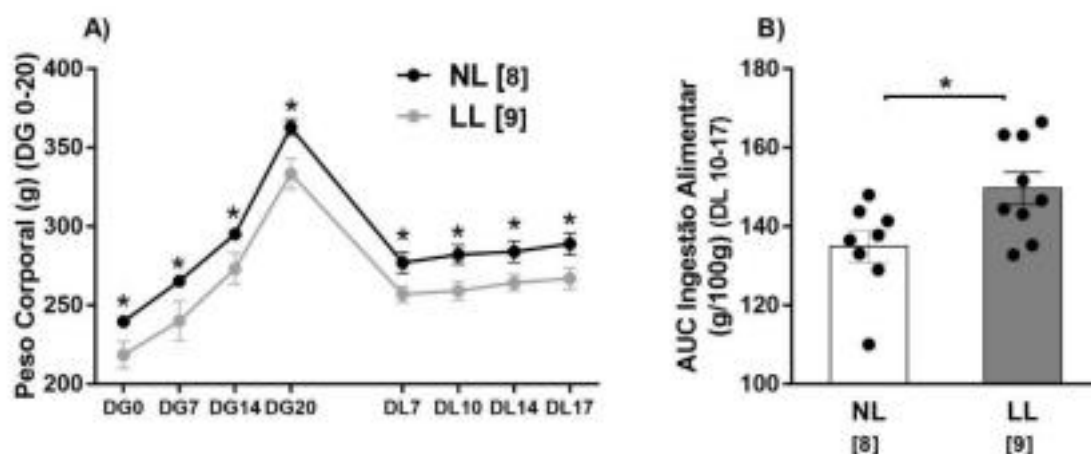


Figura 4. A) Peso corporal no período gestacional (DG 0 ao DG 20) e lactacional (DL 7 ao 17) das ratas (F1); B) Área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar das ratas (F1) no período lactacional (F2). O número de animais por grupo está descrito entre os []. DG: dia gestacional; DL: dia lactacional. * p<0,05 NL vs LL.

Tabela 1. Peso do tecido adiposo perigonadal+perirrenal (g/100g), tecido adiposo retroperitoneal (g/100g), ovários (g/100g) e útero (g/100g) de ratas (F1) NL (Normal Litter) e LL (Large Litter) no dia lactacional (DL) 21 após a eutanásia por decaptação e coleta dos tecidos. O número de animais por grupo está descrito entre [].

Grupos	NL	LL
Peso - Tecido Adiposo Perigonadal+perirrenal (g/100g)	0,855 ± 0,11 [10]	0,694 ± 0,08 [10]
Peso - Tecido Adiposo Retroperitoneal (g/100g)	0,298 ± 0,04 [9]	0,197 ± 0,02 [10]
Peso - Ovários (g/100g)	0,014 ± 0,001 [10]	0,016 ± 0,001 [10]
Peso - Útero (g/100g)	0,124 ± 0,013 [10]	0,124 ± 0,013 [10]

Dados expressos como média ± SEM. O número (n) de animais de cada grupo está descrito em [] abaixo dos dados. NL: mães (F1) de ninhada normal; LL: mães (F1) de ninhada expandida.

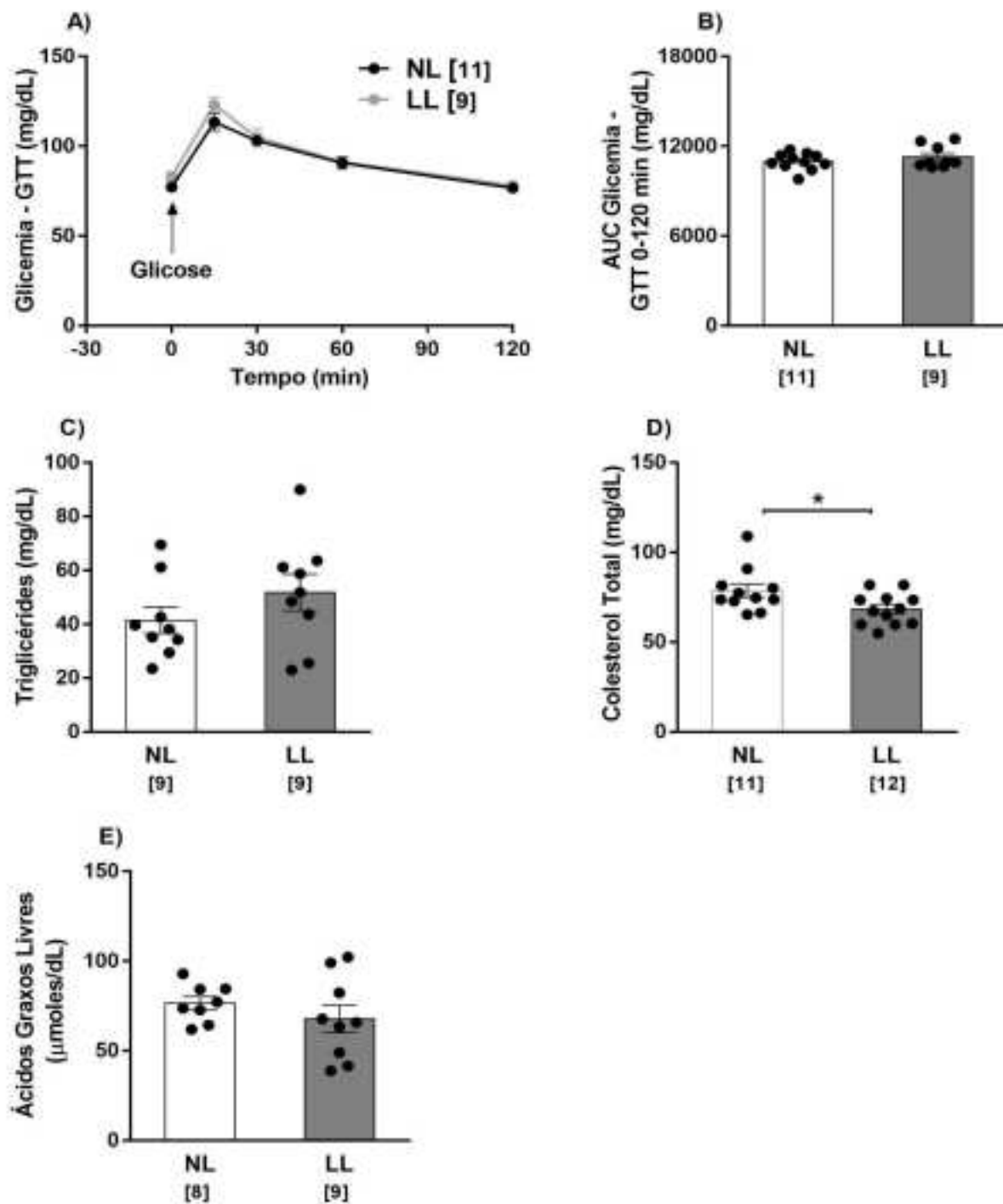


Figura 5. Teste oral de Tolerância à Glicose (oGTT) (A) e a Curva (AUC) do oGTT (B) das ratas (F1) no dia gestacional (DG) 14; Concentrações plasmáticas de triacilglicerol (mg/dL) (C), colesterol total (mg/dL) (D) e ácidos graxos livres (μmoles/dL) (E) das mães (F1) no dia lactacional (DL) 21. O número de animais por grupo está descrito em []. * p<0,05 NL vs LL.

5.2 Efeitos da subnutrição materna pré-concepcional, induzida no período neonatal pela expansão do tamanho da ninhada, nos parâmetros metabólicos de suas proles masculina e feminina (F2).

De acordo com a análise de ANOVA de medidas repetidas, houve interação entre dias (DPN 4 - 21) e grupos (Prole de mães NL e Prole de mães LL) no peso corporal da prole masculina no DPN 4 ao DPN 21 ($F_{5, 190} = 10,21$, $p < 0,0001$), com efeito dos dias ($F_{5, 190} = 1693$, $p < 0,0001$) e grupo ($F_{1, 38} = 19,16$, $p < 0,0001$). O peso corporal da prole masculina de mães LL foi menor ($p < 0,05$) nos DPN 14, 17 e 21 (Figura 6A). Não houve interação entre dias (DPN 21 - 90) e grupos (Prole de mães NL e Prole de mães LL) no peso corporal da prole masculina do DPN 21 ao DPN 90 ($F_{14, 532} = 0,8727$, $p = 0,589$), com efeito dos dias ($F_{14, 532} = 1935$, $p < 0,0001$) e grupo ($F_{1, 38} = 4,779$, $p = 0,035$). A prole masculina de mães LL apresentou peso corporal reduzido ($p < 0,05$) do DPN 21 ao DPN 90 (Figura 6C). A ANOVA de medidas repetidas mostrou que não houve interação entre dias (DPN 4 - 21) e grupos (Prole de mães NL e Prole de mães LL) no peso corporal da prole feminina do DPN 4 ao DPN 21 ($F_{5, 190} = 1,514$, $p = 0,1871$), com efeito de dias ($F_{5, 190} = 1400$, $p < 0,0001$), mas sem efeitos do grupo ($F_{1, 38} = 2,815$, $p = 0,1016$) (Figura 6B). Também não houve interação entre dias (DPN 21 - 90) e grupos (Prole de mães NL e Prole de mães LL) no peso corporal da prole feminina do DPN 21 a DPN 90 ($F_{14, 532} = 1,159$, $p = 0,3035$), com efeito dos dias ($F_{14, 532} = 1752$, $p < 0,0001$), mas sem efeitos do grupo ($F_{1, 38} = 3,35$, $p = 0,075$) (Figura 6D).

Tanto a prole masculina [$t(38) = 5,05$, $p < 0,0001$] quanto a prole feminina [$t(37) = 2,817$, $p = 0,0077$] de mães LL apresentaram aumento da ingestão alimentar em comparação com a prole de mães NL (Figura 6E, F). A prole masculina de mães LL apresentou menor distância nasoanal no DPN 21 [$t(36) = 3,56$, $p = 0,0011$] e maior no DPN 90 [$t(36) = 4,331$, $p < 0,0001$] (Figura 6I), porém apresentou menor índice de Lee no DPN 90 [$t(36) = 5,063$, $p < 0,0001$], sem diferenças no índice de Lee no DPN 21 [$t(36) = 1,847$, $p = 0,0733$] (Figura 6G). A prole feminina de mães LL apresentou distância nasoanal reduzida no DPN 21 [$t(36) = 2,584$, $p = 0,014$], sem diferenças na distância nasoanal no DPN 90 [$t(38) = 0,4728$, $p = 0,6391$] (Figura 6J), não tendo repercussões no índice de Lee no DPN 21 [$t(36) = 1,346$, $p = 0,1868$] e DPN 90 [$t(38) = 0,3393$, $p = 0,7362$] (Figura 6H).

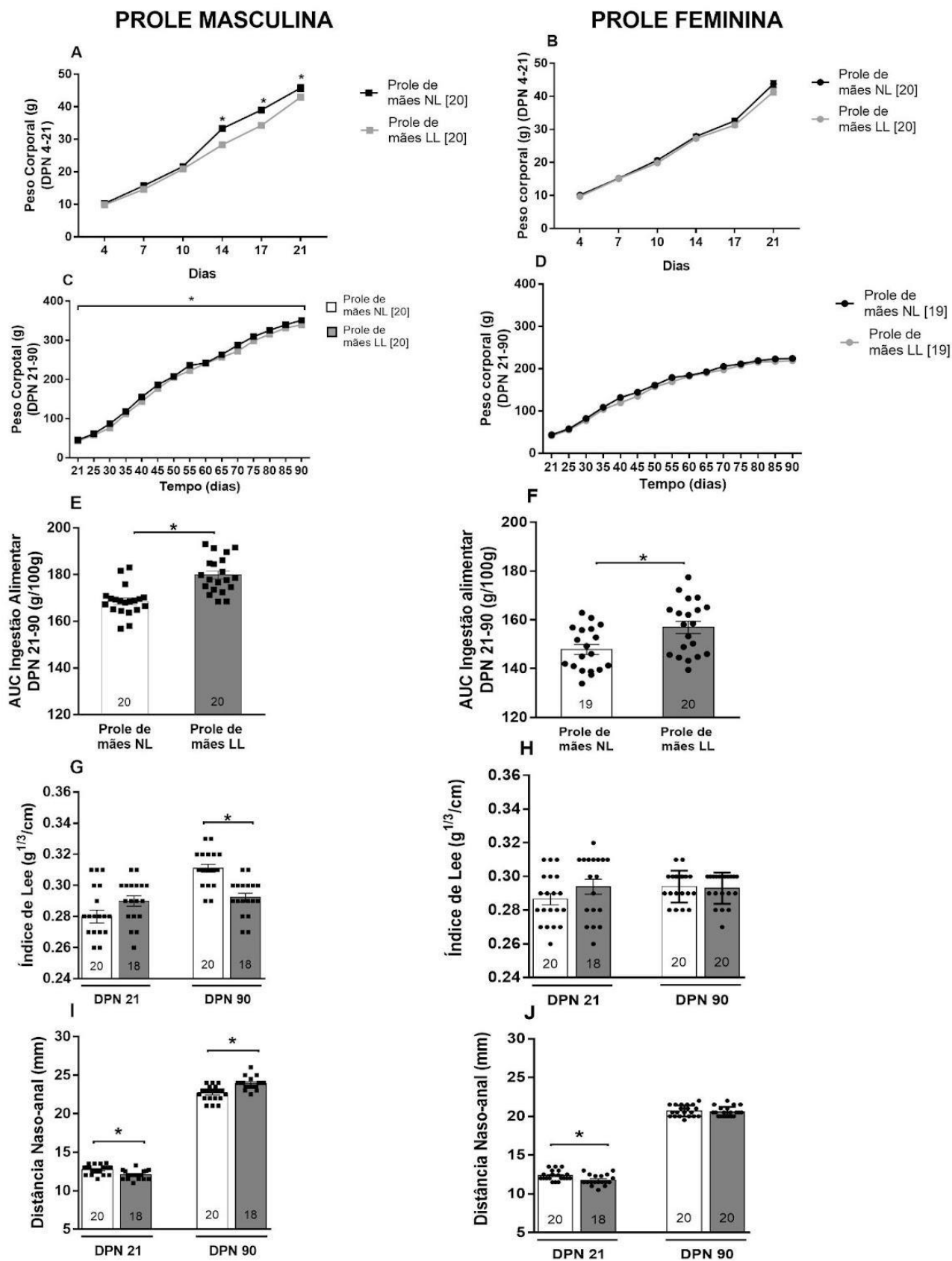


Figura 6. Peso corporal do DPN (dia pós-natal) 4 ao 21 (desmame) e do DPN 21 ao 90 da prole (F2) masculina (A, C) e feminina (B, D) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). Área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar do DPN 21 ao 90 das proles masculina (E) e feminina (F) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). Índice de Lee e distância nasoanal

no DPN 21 e 90 das proles masculina (G, I) e feminina (H, J) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). * $p < 0,05$ prole de mães NL vs prole de mães LL.

Não houve diferença no peso dos tecidos adiposos retroperitoneal e perigonadal entre as proles de mães NL e LL, tanto no sexo masculino {retroperitoneal [t(38)= 1,01, $p=0,3188$] e perigonadal [t(37)= 0,959, $p=0,3438$]} e feminino {retroperitoneal [t(37)= 0,01985, $p=0,9843$] e perigonadal+perirrenal [t(36)= 0,8285, $p=0,4129$]} (Tabela 2).

Tabela 2. Peso do tecido adiposo retroperitoneal (TAR) (g/100g) e tecido adiposo perigonadal (TAP) (g/100 g) da prole masculina (F2) de mães (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). Peso do tecido adiposo retroperitoneal (TAR) (g/100 g) e tecido adiposo perigonadal+perirrenal (TAP) (g/100 g) da prole feminina (F2) de mães (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida).

Grupos	Prole Feminina de mães NL	Prole Feminina de mães LL	Prole Masculina de mães NL	Prole Masculina de mães LL
TAR	0,90 ± 0,04 [20]	0,90 ± 0,07 [19]	0,94 ± 0,05 [20]	0,87 ± 0,05 [20]
TAP	1,90 ± 0,09 [19]	2,04 ± 0,13 [19]	1,21 ± 0,05 [20]	1,14 ± 0,05 [19]

Dados expressos como média ± SEM. O número (n) de animais de cada grupo está descrito em [] abaixo dos dados. No caso da prole feminina, o tecido adiposo perigonadal foi aferido juntamente com perirrenal.

A ANOVA de medidas repetidas do GTT na prole masculina mostrou que houve interação entre o tempo após a sobrecarga de glicose (0 a 120 min) e os grupos (Prole de mães NL e Prole de mães LL) na glicemia ($F_{4,128} = 5,891$, $p=0,0002$), com efeitos de tempo ($F_{4,128} = 387,6$, $p < 0,0001$) e grupo ($F_{1,32} = 7,446$, $p=0,0102$). A prole masculina de mães LL apresentou menores valores de glicemia após 15 ($p < 0,01$) e 30 minutos ($p < 0,001$) de administração de glicose do que a prole masculina de mães NL, além de redução da área sob a curva do GTT [t(32)= 2,806, $p=0,0085$] (Figura 6A, C). Para a prole feminina, não houve interação entre o tempo após a sobrecarga de glicose (0 a 120 min) e os grupos

(Prole de mães NL e Prole de mães LL) na glicemia (F4,76=0,5962, p=0,6665), com efeitos do tempo (F4, 76=222,2, p<0,0001), mas sem efeitos de grupo (F1,19=0,0046, p=0,9466), além de não haver diferença na área sob a curva do GTT [t(38)=0,0842, p=0,9333] (Figura 6B, D).

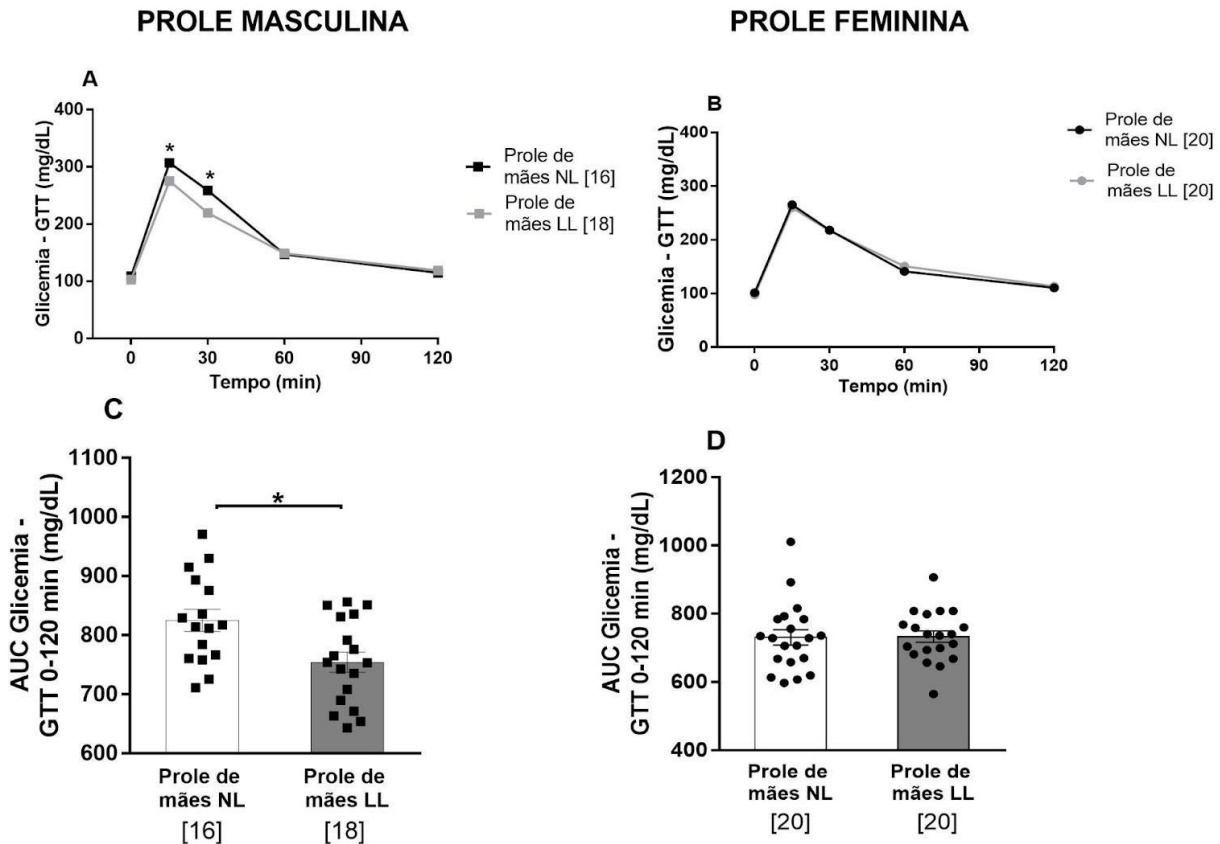


Figura 7. Teste de Tolerância à Glicose (GTT; mg/dL) e a área sob a curva (AUC) do GTT da prole masculina e feminina (F2) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). * p<0,05 prole de mães NL vs prole de mães LL.

A prole masculina de mães LL apresentou aumento na concentração plasmática de insulina quando comparada à prole masculina de mães NL [t(13)=2,368, p=0,0341] (Figura 7A), sem diferenças na prole feminina [t(16)=0,6545, p=0,5221] (Figura 7B). A prole masculina de mães LL apresentou menor concentração plasmática de triacilglicerol que a prole masculina de mães NL [t(27)=3,671, p=0,0011] (Figura 7C), sem diferença na prole feminina neste parâmetro [t(27)=0,8803, p=0,3865] (Figura 7D). Não houve diferenças nas concentrações plasmáticas de colesterol total nas proles masculina [t(28)= 0,4292, p=0,6711] e feminina [t(28)=0,4819, p=0,6336] (Figura 7E, F), bem como de ácidos graxos livres nas proles masculinas [t(28)= 0,8251, p=0,4163] e feminina [t(27)= 1,093, p=0,2839]

(Figura 7G, H).

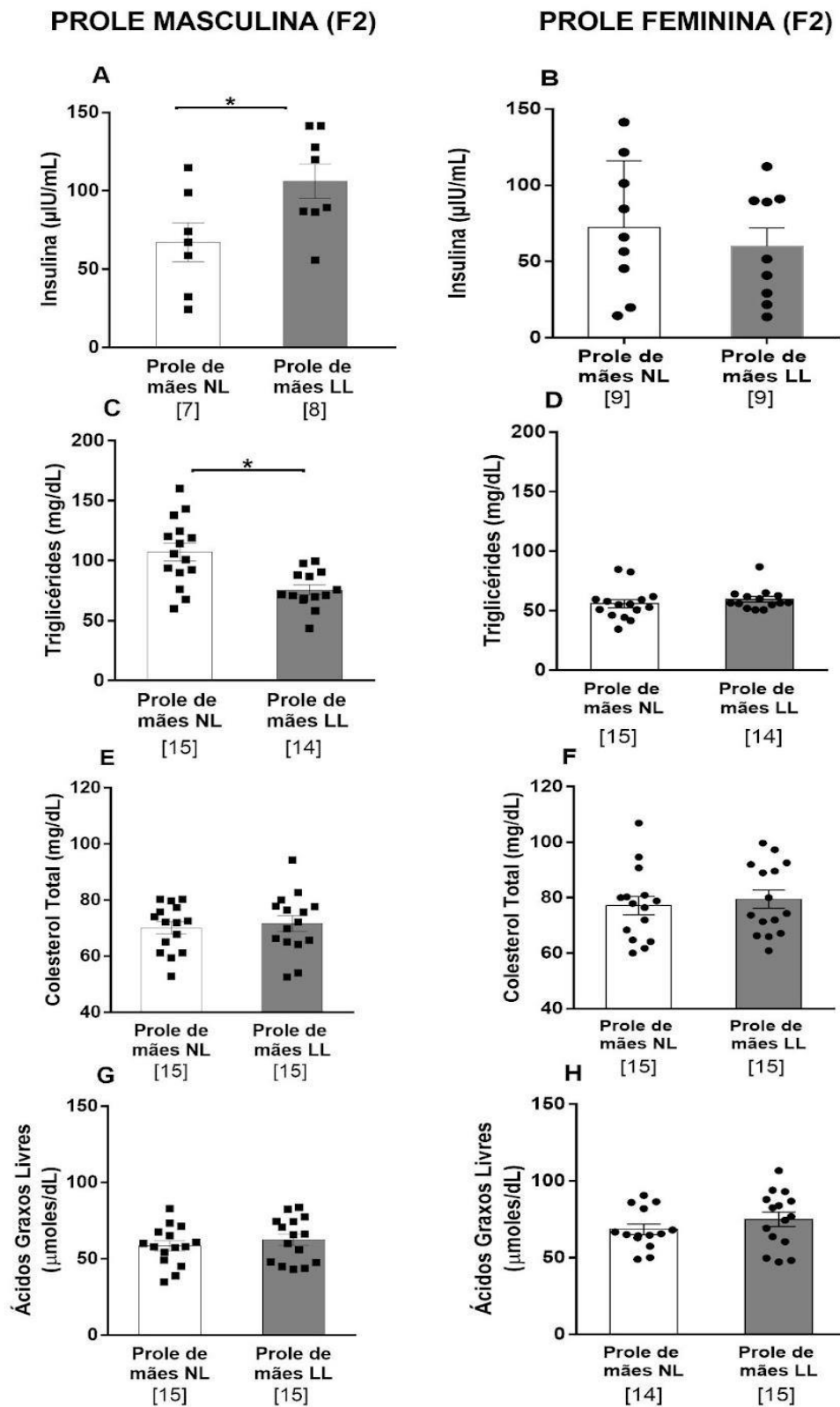


Figura 8. Concentrações plasmáticas de insulina ($\mu\text{U/mL}$), colesterol total (mg/dL), triacilglicerol (mg/dL) e ácidos graxos livres ($\mu\text{moles/dL}$) da prole (F2) masculina e feminina de ratos (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida). * $p < 0,05$ prole de mães NL vs prole de mães LL.

5.3 Efeitos da subnutrição materna pré-concepcional, induzida no período neonatal pela expansão do tamanho da ninhada, nos parâmetros reprodutivos de suas proles masculina e feminina (F2).

Não houve diferença entre as proles masculina de mães NL e LL no descolamento do prepúcio [t(38)=0,1593, p=0,8743], peso dos testículos [t(31)=0,8487, p=0,4026] e concentrações plasmáticas de testosterona [t(17)=0,6469, p=0,5263] (Tabela 3). Nas proles femininas, não foi observada diferença entre os grupos na abertura vaginal [t(38)=0,1215, p=0,9039], primeiro estro [t(38)=0,9087, p=0,3692], início da ciclicidade [t(38)=0,9221, p=0,3623], duração do ciclo estral [t(38)=0,7113, p=0,4813], coeficiente de diestro I e II [t(38)=0,9301, p=0,3582], coeficiente de estro [t(38)=0,8608, p=0,3947], coeficiente de proestro [t(33)=1,169, p=0,2507], concentrações plasmáticas de estradiol [t(17)=0,1036, p=0,9187] e pesos dos ovários [t(36)=0,3712, p=0,7127] e útero [t(38)=0,05655, p=0,9552] (Tabela 4).

Tabela 3. Descolamento do prepúcio (DPN), peso dos testículos (g/100g) e concentração plasmática de testosterona (ng/mL) da prole masculina (F2) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida).

Grupos	Prole Masculina de mães NL	Prole Masculina de mães LL
Descolamento do prepúcio	45,1 ± 0,54 [20]	45,0 ± 0,31 [20]
Peso dos Testículos	0,41 ± 0,07 [18]	0,43 ± 0,04 [15]
Testosterona	1,78 ± 0,13 [9]	2,02 ± 0,32 [10]

Dados expressos como média ± SEM. O número (n) de animais de cada grupo está descrito em [] abaixo dos dados.

Tabela 4. Abertura vaginal (DPN), primeiro estro (DPN), regularização do ciclo (DPN), duração do ciclo (dias), coeficiente proestro (%), coeficiente estro (%), coeficiente diestro (I e II) (%), concentração plasmática de estradiol (pg/mL), peso dos ovários e útero (g/100g) da prole feminina (F2) de ratas (F1) NL (ninhada normal) e LL (ninhada expandida).

Grupos	Prole Feminina de mães NL	Prole Feminina de mães LL
Abertura vaginal	32,1 ± 0,34 [20]	32,1 ± 0,22 [20]
Primeiro estro	34,5 ± 0,65 [20]	33,8 ± 0,39 [20]
Duração do ciclo	4,41 ± 0,18 [20]	4,24 ± 0,14 [20]
Regularização do ciclo	48,7 ± 0,58 [20]	49,4 ± 0,48 [20]
Coeficiente Proestro	22,0 ± 0,77 [17]	23,2 ± 0,67 [18]
Coeficiente Estro	23,4 ± 0,76 [20]	24,3 ± 0,77 [20]
Coeficiente Diestro I e II	53,1 ± 1,06 [20]	51,9 ± 0,80 [20]
Estradiol	41,1 ± 4,05 [9]	40,7 ± 1,94 [10]
Peso dos Ovários	0,02 ± 0,00 [20]	0,02 ± 0,00 [18]
Peso do Útero	0,21 ± 0,009 [20]	0,21 ± 0,008 [20]

Dados expressos como média ± SEM. O número (n) de animais de cada grupo está descrito em [] abaixo dos dados.

6. DISCUSSÃO

Os estudos "DOHaD" (Origens desenvolvimentistas da Saúde e da Doença) são de grande relevância para as políticas dos órgãos de saúde pública, e a expansão do tamanho da ninhada é um modelo DOHaD utilizado para estudar a subnutrição no período lactacional e suas consequências na vida adulta e das próximas gerações. O modelo experimental utilizado no presente estudo consistiu de ratas Wistar provenientes de ninhada normal (normal litter - 10 filhotes) e ninhada expandida (large litter - 16 filhotes). Essas fêmeas (F1) de ninhada expandida possuíram menor disponibilidade ao leite materno e ingeriram menor quantidade de leite, conseqüentemente, foi gerada subnutrição nestes animais. Após o desmame, foi oferecida dieta nutricional adequada e *ad libitum* até o fim do protocolo. As proles (F2) utilizadas neste estudo receberam acesso considerado normal ao leite materno e, após o desmame, dieta nutricional adequada e *ad libitum* até o DPN 90. Apesar da prole de ambos os sexos (F2) apresentarem alterações metabólicas devido à subnutrição materna induzida pela expansão do tamanho da ninhada na lactação (F1), este trabalho demonstra que há um dimorfismo sexual, visto que a prole masculina (F2) foi mais suscetível aos efeitos metabólicos, sendo observados pela redução do peso corporal, apesar do aumento da ingestão alimentar; menor índice de Lee, maior distância nasoanal, maior concentração plasmática de insulina e menor de triacilglicerol, além da menor glicemia após sobrecarga de glicose; no entanto, não foram observadas alterações nos parâmetros reprodutivos tanto na prole masculina quanto na prole feminina.

Modificações epigenéticas induzidas nos pais (F1) pelo ambiente podem ser herdadas através da linhagem germinativa e causar alterações hereditárias na sua prole (F2) (CISSÉ et al., 2018). Estudos demonstraram que a subnutrição materna (F1) leva a alterações epigenéticas, como a metilação do DNA e modificações de histonas (WOODALL et al., 1996; DE MOURA et al., 2007) e micro RNAs não codificantes (miRNA) (PUPPALA et al., 2018) no fígado da prole. Sabe-se que animais provenientes de ninhadas expandidas (LL, neste caso a F1) não recebem a quantidade adequada de leite durante o período de lactação, além de haver alteração na composição do leite, com déficit lipídico (YEH et al., 1982; FIOROTTO et al., 1991; LÓPEZ-SOLDADO et al., 2006; REMMERS et al., 2008), e conseqüentemente atraso ou redução no ganho de peso corporal desses animais (ORTIZ MUNIZ et al., 1996; DORANTES-BARRIOS et al., 2021). Além disso, já é descrito na literatura que a subnutrição induzida pela expansão do tamanho da ninhada no período lactacional (F1 - LL) causa outras alterações metabólicas e reprodutivas. Por exemplo, esses animais (F1) apresentam aumento da sensibilidade à insulina e menor concentração plasmática de triacilglicerol (PRIOR et al., 2008; PATTERSON et al., 2010), além de atraso no início da puberdade, menor peso dos ovários/útero e redução na taxa de fertilidade

dessas fêmeas (CASTELLANO et al., 2011; CARON et al., 2012).

Nesse contexto, ratas Wistar provenientes de ninhada expandida (F1 - LL), mães das proles utilizadas no presente trabalho, apresentam crescimento longitudinal reduzido, menor peso corporal desde a infância até a idade adulta (*dados não publicados*), incluindo períodos de gestação e lactação, apesar de apresentarem hiperfagia. De fato, está bem estabelecido na literatura que a subnutrição materna, tanto em modelos humanos quanto em roedores, causa alterações na programação da progênie, tais como doenças metabólicas (ROSEBOOM et al., 2001; VICTORA et al., 2008; FACCHI et al., 2020). De acordo com isso, a subnutrição materna nos períodos pós-concepcionais, como gestação e/ou lactação, e seus efeitos na prole tem sido amplamente explorados, mostrando que essa prole apresenta menor peso corporal desde o desmame até a idade adulta e maior ingestão alimentar, além de valores plasmáticos aumentados de triacilglicerol e colesterol total (ZAMBRANO et al., 2006; JIMENEZ-CHILLARON et al., 2006; de OLIVEIRA et al., 2012; MIRANDA et al., 2022). No entanto, são poucos os estudos que exploram os efeitos da subnutrição materna (F1) nos períodos pré-concepcionais sobre a prole (F2).

O presente trabalho mostra, pela primeira vez, que algumas respostas observadas em matrizes (F1) com subnutrição lactacional induzida pela expansão da ninhada no período pré-concepcional também aparecem em suas proles (F2), uma vez que proles de ambos os sexos apresentaram crescimento longitudinal reduzido durante a lactação e hiperfagia após o desmame, alterações observadas nas ratas (F1) subnutridas. De acordo com isso, pesquisas com humanos mostram que crianças desnutridas apresentam recuperação do crescimento, envolvendo aumento da ingestão alimentar (GAT-YABONSKI & PHILLIP, 2015). Além disso, o aumento da liberação do neuropeptídeo Y (NPY), um neuropeptídeo orexígeno (SCHWARTZ et al., 2000), foi relatado em animais LL (F1) (PLAGEMANN et al., 1999). Assim, é possível que a hiperfagia das proles de mães LL (F2) também possa estar relacionada com o aumento da atividade das vias orexígenas. Contudo, o comprimento linear reduzido ao desmame, avaliado pela distância nasoanal, em proles de machos e fêmeas (F2) descendentes de mães LL (F1), sugere que a subnutrição materna pode induzir alterações nas concentrações plasmáticas e/ou ação do hormônio do crescimento (GH) (REYNOLDS et al., 2014), insulina e/ou hormônio tireoidiano durante lactação, visto que são os principais hormônios envolvidos na regulação do crescimento (MASTERNAK & BARTKE, 2012; GAT-YABLONSKI & DE LUCA, 2017).

O hormônio do crescimento (GH) é considerado o principal regulador do crescimento pós-natal e do desenvolvimento somático (REYNOLDS et al., 2014; ZHU et al., 2017) e a subnutrição materna durante a lactação (F1 - LL) causa redução do comprimento corporal associada à menor expressão de GH no desmame em ratos (WOODALL et al., 1996). Além disso, durante a gestação, a restrição calórica materna foi associada a uma ação reduzida

do GH no desmame da prole (LISBOA et al., 2003). A terapia com hormônio do crescimento, antes ou após o desmame, tem sido usada para tratar o déficit de crescimento pós-natal na prole após subnutrição materna (ZHU et al., 2017). Por outro lado, a restrição calórica materna durante a gestação reduziu a concentração plasmática de insulina no nascimento, mas não no período lactacional ou desmame da prole (LISBOA et al., 2003). Adicionalmente, a subnutrição materna durante a lactação promoveu concentrações plasmáticas reduzidas de T4 e elevados de T3 durante a lactação e no desmame da prole (LISBOA et al., 2003). Assim, pode-se sugerir que a redução da atividade do eixo somatotrópico esteja relacionada à redução no crescimento longitudinal durante a lactação na prole de ratas com restrição calórica.

Howie e colaboradores, em 2012, demonstraram que a duração e o grau de subnutrição são fatores determinantes para o desenvolvimento da prole, e seus efeitos são sexo-específicos. Os resultados do presente estudo mostram que os efeitos metabólicos da subnutrição materna induzida pela expansão do tamanho da ninhada (F1) na prole (F2) também são sexo-dependentes, como visto pela redução do peso corporal desde a lactação até a idade adulta, aumento da insulinemia, associada a menores valores de glicemia após sobrecarga de glicose e concentração plasmática de triacilglicerol, além de comprimento longitudinal aumentado na idade adulta na prole masculina de mães LL, mas não na prole feminina.

O aumento da concentração plasmática de insulina, a redução da glicemia após sobrecarga de glicose e menor área sob a curva (AUC) de GTT na prole masculina de mães LL, sem diferença na prole feminina, está de acordo com outros estudos que relataram que a prole feminina de fêmeas com subnutrição induzida por restrição proteica durante a lactação tem menor concentração plasmática de insulina do que a prole masculina, sugerindo um efeito protetor dos hormônios femininos, e impedindo que a concentração plasmática de insulina nas fêmeas se eleve, evidenciando uma mudança hormonal sexo-específica (DESAI et al., 1997; BAÑOZ-GOMEZ et al., 2016). Além disso, a maior concentração plasmática de insulina na prole masculina de mães LL pode prevenir altos picos de glicemia após sobrecarga de glicose. Adicionalmente, a maior insulinemia de prole masculina de mães subnutridas também poderia justificar a menor concentração plasmática de triacilglicerol observada nesse grupo, uma vez que sabe-se que a insulina inibe a produção de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) pelo fígado, as quais contêm triacilglicerol produzidos pelos hepatócitos a partir de ácidos graxos adquiridos da circulação ou sintetizados a partir da glicose ou outros precursores não lipídicos por lipogênese *de novo* (HEEREN & SCHEGA, 2021). Reforçando nossos dados, um estudo realizado por Fuente-Martín e colaboradores (2012) demonstrou que a nutrição materna

(F1), crescimento fetal e o crescimento pós-natal (F2) têm sido associados a possíveis alterações na sensibilidade à insulina, com alguns desses efeitos sendo sexualmente dimórficos.

Curiosamente, apesar do peso corporal reduzido ao longo da vida, a prole masculina de mães subnutridas apresentou distância nasoanal aumentada na idade adulta, evidenciando *catch-up* (recuperação) no crescimento longitudinal, e este efeito também foi observado na prole feminina, tendo em vista que a prole de mães LL alcançou a prole de mães NL na idade adulta. Dessa forma, o fenótipo magro das fêmeas LL (F1) também aparece na sua prole masculina (F2), a qual também apresenta comprimento longitudinal aumentado, podendo ser atribuído a um *catch up* de hormônios envolvidos na regulação do crescimento após o desmame e/ou a partir da puberdade. Essa hipótese é reforçada por Moura e colaboradores (2007), que demonstraram que a restrição energética materna (F1) durante a lactação causou redução do comprimento corporal associada à menor expressão de GH no desmame em ratos, porém um aumento do comprimento corporal associado ao aumento da expressão de GH na idade adulta da prole (F2).

Alterações sexo-específicas para diferentes desafios metabólicos têm sido cada vez mais evidenciadas na literatura. Nesse sentido, ratos machos apresentaram maior susceptibilidade aos efeitos anabólicos dos glicocorticoides do que as fêmeas (STOPA et al., 2019), e os camundongos machos possuem maior propensão a desenvolver obesidade do que as fêmeas em resposta à dieta hiperlipídica (HONG et al., 2009). Além disso, animais machos foram mais suscetíveis do que fêmeas a deficiências alimentares precoces, radiação e estresse de manuseio (CRUTCHFIELD & DRATMAN, 1980). Um estudo feito por Bañoz-Gómez e colaboradores (2016) sugere que os estrógenos femininos apresentam efeito protetor contra alterações drásticas na regulação metabólica das fêmeas. É relevante ressaltar que diferenças sexo-específicas no balanço energético em resposta à restrição calórica foram demonstradas por Valle e colaboradores, 2005 (VALLE et al., 2005), que concluíram que as ratas parecem diminuir o gasto energético, protegendo os órgãos metabolicamente ativos em maior extensão do que os machos durante a restrição calórica, e que essa resposta sexo-dependente pode ser crítica para alcançar a conservação de energia nas fêmeas, favorecendo sua sobrevivência e preservação da espécie. Considerando a manipulação do tamanho da ninhada e a nutrição lactacional, um estudo recente observou uma resposta sexo-específica na prole de fêmeas com obesidade induzida pela superalimentação na lactação (SL - F1), em que apenas a prole masculina apresentou disfunção cardíaca (FERREIRA et al., 2022). Este estudo também demonstrou que tanto a prole masculina quanto feminina de mães com supernutrição neonatal apresentam alterações nas concentrações plasmáticas de hormônios sexuais (FERREIRA

et al., 2022).

Os esteroides sexuais influenciam diretamente o metabolismo dos adipócitos (MATTSSON & OLSSON, 2007; FUENTE-MARTÍN et al., 2012). Porém, as diferenças metabólicas observadas entre machos e fêmeas não podem ser totalmente explicadas pelas distinções hormonais pós-púberes entre eles (WANG et al., 2011; FUENTE-MARTÍN et al., 2012). O ambiente pré-natal de esteroides sexuais induz comportamentos e funções sexualmente dimórficas em roedores (GORSKI, 2002), e estudos demonstraram como alterações nas concentrações de esteroides sexuais durante o período neonatal afetam tanto o crescimento longitudinal quanto a composição corporal (CHOWEN et al., 1993; LAZIC et al., 2011). Assim, as diferenças relacionadas ao sexo na composição corporal e nas respostas às alterações nutricionais são provavelmente resultado de distinções genéticas inatas entre os sexos, que interagem com ambientes hormonais neonatais e pós púberes, que também são influenciados pelo sexo do animal (FUENTE-MARTÍN et al., 2012). Este dimorfismo sexual pode ser explicado, em parte, pela sinalização distinta de hormônios sexuais entre machos e fêmeas (CISSÉ et al., 2018).

O trabalho de Bañoz Gómez e colaboradores, 2016, mostrou que na subnutrição materna induzida pela restrição calórica (F1) durante o período gestacional e pós-natal (F2), seguida de uma oferta nutricional inadequada, os hormônios femininos regulam as concentrações plasmáticas de insulina na idade adulta, onde as fêmeas apresentam concentração plasmática de insulina menores do que os machos. Curiosamente, um trabalho realizado por Cissé e colaboradores (2018) mostrou que as diferenças sexo-específicas entre as proles de mães subnutridas por restrição nutricional durante a gestação puderam ser explicadas pelos genes que regulam a biossíntese de triacilglicerol, visto que tiveram maior modulação em fígados femininos, enquanto aqueles envolvidos na oxidação de ácidos graxos tiveram maior modulação em fígados masculinos.

Assim, o presente trabalho mostra que a prole (F2) de matrizes (F1) com subnutrição lactacional induzida pela expansão do tamanho da ninhada, ou seja, em um modelo pré-concepção, resulta em alterações metabólicas, principalmente na prole masculina, sem afetar a reprodução na prole de ambos os sexos. Até onde sabemos, este estudo é o primeiro a demonstrar que a subnutrição pré-concepcional nas mães (F1), especificamente a subnutrição induzida durante a lactação, cujos efeitos permanecem na mãe até a idade adulta, é responsável por distúrbios metabólicos na prole masculina, mas não na prole feminina. Nossos dados, juntamente com os dados mostrados por Kwong e colaboradores (2000), demonstraram que a subnutrição materna (F1) durante a fase de pré-concepcional pode gerar alterações a longo prazo em sua prole, como em seu crescimento pós-natal. Esses dados, juntamente com dados mostrados por Ferreira e colaboradores (2022),

sugerem que o estado metabólico das mães (F1) pode ser responsável por alterações metabólicas e/ou reprodutivas na prole, e ambientes nutricionais opostos da mãe podem induzir consequências distintas, porém obtendo respostas sexo-específicas, onde geralmente os machos possuem maior propensão a apresentar alterações do que as fêmeas, visto que as fêmeas parecem possuir maior capacidade de manter a homeostase frente a desafios metabólicos do que machos.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho investigou as possíveis alterações metabólicas e reprodutivas nas proles (F2) masculina e feminina de ratas (F1) subnutridas por expansão do tamanho da ninhada. As ratas F1 apresentaram alterações metabólicas, e com o presente estudo, conclui-se que a subnutrição lactacional materna induzida pela expansão do tamanho da ninhada, em um modelo pré-concepcional, onde as ratas (F1) tiveram acesso a dieta nutricional adequada após a lactação até a vida adulta, causa alterações metabólicas na prole (F2). Tais alterações tiveram maiores repercussões na prole masculina, porém sem efeitos reprodutivos na prole de ambos os sexos. Esse dimorfismo sexual reforça a hipótese de que as fêmeas têm maior capacidade de manter a sua homeostase frente a desafios metabólicos.

8. REFERÊNCIAS

- Babicky A, Paríxek J, Ostádalová I et al. Initial solid food intake and growth of young rats in nests of different sizes. **Physiol Bohemoslov**. v. 22, p 557-566, 1973.
- Balaban G, Silva GAP, Dias MLCM et al. Does breastfeeding prevent childhood overweight? **Rev. Bras. Saude Mater. Infant**. v. 4, n. 3, 2004.
- Bañoz-Gómez, R. et al. Undernutrition in the parental and first generation provokes an organ-specific response to oxidative stress on neonates of second filial generation of Wistar rats. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**. v. 101, p. 267–274, 2016.
- Bassett DR, Craig BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. **Journal of Applied Physiology**. v. 64, n. 3, p. 1249–1256, 1988.
- Benyshek DC. The “early life” origins of obesity-related health disorders: new discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. **Am J Phys Anthropol**. v. 152, n. 57, p. 79–93, 2013.
- Bernardis LL & Patterson BD. 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.

Bhutta ZA, Ahmed T, Black RE et al. What works? Interventions for maternal and child undernutrition and survival. **The Lancet**. v. 371, n. 9610, p. 417–440, 2008.

Black RE, Cousens S, Johnson HL et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: Systematic analysis. **The Lancet**. v. 375, p. 1969–1987, 2010.

Cancian CRC. **A manipulação da prole durante o período lactacional modifica a morfofisiologia materna**. Ponta Grossa, 2014. Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Caron E, Ciofi P, Prevot V et al. Alteration in neonatal nutrition causes perturbations in hypothalamic neural circuits controlling reproductive function. **Journal of Neuroscience**. v. 32, n. 33, p. 11486-11494, 2012.

Castellano, JM, Bentsen AH, Sanchez-Garrido MA et al. Early metabolic programming of puberty onset: impact of changes in postnatal feeding and rearing conditions on the timing of puberty and development of the hypothalamic kisspeptin system. **Endocrinology**. v. 152, n. 9, p. 3396-3408, 2011.

Cissé O, Fajardy I, Delahaye F et al. Effect of diet in females (F1) from prenatally undernourished mothers on metabolism and liver function in the F2 progeny is sex-specific. **European Journal of Nutrition**. v. 58, n. 6, p. 2411-2423, 2019.

Chowen JA, Argente J, González-Parra S et al. Differential effects of the neonatal and adult sex steroid environments on the organization and activation of hypothalamic growth hormone-releasing hormone and somatostatin neurons. **Endocrinology**. v. 133, n. 6, p. 2792–2802, 1993.

Crutchfield FL, Dratman MB. Growth and Development of the Neonatal Rat: Particular Vulnerability of Males to Disadvantageous Conditions during Rearing. **Neonatology**. v. 38, n. 3-4, p. 203-209, 1980.

Dean W, Bowden L, Aitchison A et al. Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell-derived mouse fetuses: association with aberrant phenotypes. **Development**. v. 125, p. 2273-2282, 1998.

de Moura EG, Lisboa PC, Custódio CM et al. Malnutrition during lactation changes growth hormone mRNA expression in offspring at weaning and in adulthood. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 18, n. 2, p. 134-139, 2007.

de Oliveira JC, Grassioli S, Gravena C, et al. Early postnatal low-protein nutrition, metabolic programming and the autonomic nervous system in adult life. **Nutr Metab**. v. 9, n. 1, p. 80, 2012.

Desai, M, Byrne, C, Meeran, K, et al. Regulation of hepatic enzymes and insulin levels in offspring of rat dams fed a reduced-protein diet. **American Journal Physiology**. v. 273, n. 4-1, p. 899-899, 1997.

de Souza CF, Stopa ERS, Martins AB et al. Lactation overnutrition-induced obesity impairs effects of exogenous corticosterone on energy homeostasis and hypothalamic-pituitary adrenal axis in male rats. **Life Sciences**. v. 304, 120721, 2022.

- Dorantes-Barrios CJ, Domínguez-Salazar E, González-Flores O et al. Behavioral consequences of postnatal undernutrition and enriched environment during later life. **Physiology & Behavior**. v. 241, 113566, 2021.
- dos Santos AH, Vieira ML, de Azevedo-Camin N et al. Utero and lactational exposure to fluoxetine delays puberty onset in female rats offspring. **Reprod. Toxicol**. v. 62, p. 1–8, 2016.
- Facchi JC, Lima TAL, Oliveira LR et al. Perinatal programming of metabolic diseases: The role of glucocorticoids. **Metabolism**. v. 104, 154047, 2020.
- Ferreira LA, Ferreira-Junior MD, Amaral KJV, et al. Maternal postnatal early overfeeding induces sex-related cardiac dysfunction and alters sexually hormones levels in young offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 103, 108969, 2022.
- Fiorotto ML, Burrin DG, Pérez M et al. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 260, n. 6, p. 1104-1113, 1991.
- Fuente-Martín E, Granado M, Garcia-Cáceres C et al. Early nutritional changes induce sexually dimorphic long-term effects on body weight gain and the response to sucrose intake in adult rats. **Metabolism Clinical and Experimental**. v. 61, p. 812-822, 2012.
- Gat-Yablonski G, De Luca F. Effect of Nutrition on Statural Growth. **Hormone Research in Pediatrics**. v. 88, n. 1, p. 46–62 2017.
- Gat-Yablonski G & Phillip M. Nutritionally-induced catch-up growth. **Nutrients**. v. 7 n. 1, p. 517-551, 2015.
- Gaytan F, Bellido C, Aguilar R et al. Balano prepucial separation as an external sign of puberty in the rat: correlation with histologic testicular data. **Andrologia**. v. 20, p. 450-3, 1988.
- Goodspeed D, Seferovic MD, Holland W et al. Essential nutrient supplementation prevents heritable metabolic disease in multigenerational intrauterine growth-restricted rats. **FASEB J**. v. 29, p. 807–819, 2015.
- Gonzalez-Rodriguez P, Cantu J, O'Neil D et al. Alterations in expression of imprinted genes from the H19/IGF2 loci in a multigenerational model of intrauterine growth restriction (IUGR). **American Journal of Obstetrics and Gynecology**. v. 214, n. 5, p. 625.e1-625.e11, 2016.
- Gorski RA. Hypothalamic imprinting by gonadal steroid hormones. **Adv Exp Med Biol**. v. 511, p. 57-70, 2002.
- Hardikar AA, Satoor SN, Karandikar MS et al. Multigenerational undernutrition increases susceptibility to obesity and diabetes that is not reversed after dietary recuperation. **Cell Metabolism**. v. 22, n. 2, p. 312-319, 2015.
- Heeren J, Schega L. Metabolic-associated fatty liver disease and lipoprotein metabolism. **Molecular Metabolism**. v. 50, n.9, 101238, 2021.
- Hong J, Stubbins RE, Smith RR et al. Differential susceptibility to obesity between male, female and ovariectomized female mice. **Nutritional Journal**. v. 8, n. 11, 2009.

- Jimenez-Chillaron JC, Hernández-Valencia M, Lightner A et al. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. **Diabetologia**. v. 49, n. 8, p. 1974-1984, 2006.
- Jimenez-Chillaron JC, Isganaitis E, Charalambous M et al. Intergenerational transmission of glucose intolerance and obesity by in utero undernutrition in mice. **Diabetes**. v. 58, p. 460–468, 2009.
- Kwong WY, Wild AE, Roberts P et al. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. **The Company of Biologists**. v. 127 p. 4195-4202, 2000.
- Lazic M, Aird F, Levine JE et al. Prenatal androgen treatment alters body composition and glucose homeostasis in male rats. **Journal of Endocrinology**. v. 208, n. 3, p. 293-300, 2011.
- Lisboa PC, Passos MCF, Dutra SCP et al. Increased 5-iodothyronine deiodinase activity is a maternal adaptive mechanism in response to protein restriction during lactation. **Journal of Endocrinology**. v. 177, n. 2, p. 261–267, 2003.
- López-Soldado I, Munilla MA, Herrera E. Long-term consequences of undernutrition during suckling on glucose tolerance and lipoprotein profile in female and male rats. **British journal of nutrition**. v. 96, n. 6, p. 1030-1037, 2006.
- Martorell R & Zongrone A. Intergenerational Influences on Child Growth and Undernutrition. **Pediatric and Perinatal Epidemiology**. v. 26, p. 302-314, 2012.
- Masternak M, Bartke A. Growth hormone, inflammation and aging. **Pathobiology of Aging & Age-related Diseases**. v.2, n. 1, 17293, 2012.
- Mattsson C, Olsson T. Estrogens and glucocorticoid hormones in adipose tissue metabolism. **Curr Med Chem**. v. 14, n. 27, p. 2918-2924, 2007.
- McMillen IC, Adam CL, Muhlhausler BS. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. **J Physiol**. v. 565, n. 1, 9–17, 2005. Miranda GDS, Lima TAP, Costermani HO et al. Breastfeeding undernutrition changes iBAT involved thermogenesis protein expression and leads to a lean phenotype in adult rat offspring. **Journal of Nutrition Biochemistry**. v. 99, 108857, 2021.
- Miranda GDS, Lima TAL, Costermani HO et al. Breastfeeding undernutrition changes iBAT-involved thermogenesis protein expression and leads to a lean phenotype in adult rat offspring. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 99, n. 108857, 2022.
- Mozes S, Sefcikova Z, Racek L. Long-term effect of altered nutrition induced by litter size manipulation and cross-fostering in suckling male rats on development of obesity risk and health complications. **Eur J Nutr**. v. 53, n. 5, p. 1273–1280, 2014.
- Neville MC, Anderson SM, Mcmanaman JL et al. Lactation and Neonatal Nutrition: Defining and Refining the Critical Questions. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**. v. 17, n. 2, p. 167-188, 2012.
- Organização Mundial de Saúde. **WHO | World Health Organization**. 2019-2021.

- Ortiz-Muniz RCB, Edith & Perez, Gonzalez L et al. Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. **Med. Sci. Res.** v. 24, p. 843–846, 1996.
- Patterson AG, Gich I, Amini SB et al. Insulin requirements throughout pregnancy in women with type 1 diabetes mellitus: three changes of direction. **Diabetologia.** v. 53, p. 446-451, 2010.
- Plagemann A, Harder T, Melchior K et al. Elevation of hypothalamic neuropeptide Y neurons in adult offspring of diabetic mother rats. **Neuroreport.** v. 10, p. 3211–3216, 1999.
- Prior LJ, Velkoska E, Watts R et al. Undernutrition during suckling in rats elevates plasma adiponectin and its receptor in skeletal muscle regardless of diet composition: a protective effect? **International journal of obesity.** v. 32, n. 10, p. 1585-1594, 2008.
- Puppala S, Li C, Glenn JP et al. Primate fetal hepatic responses to maternal obesity: epigenetic signaling pathways and lipid accumulation. **J Physiol Mar.** v. 596, n. 23, p. 5823-5837, 2018.
- Reik W, Romer I, Barton SC et al. Adult phenotype in the mouse can be affected by epigenetic events in the early embryo. **Development.** v. 119, p. 933-942, 1993.
- Remmers F, Fodor M, Delemarre-van de Waal HA. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. **Physiology & behavior.** v. 95, n. 1-2, p. 208-215, 2008.
- Reynolds CM, Li M, Gray C et al. Early-life growth hormone treatment to offspring of undernourished mothers alters metabolic parameters in primary adipocytes in adulthood. **Growth Factors.** v. 32, n. 1, p. 34–40, 2014.
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Ravelli AC, et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v. 185, n. 1-2, p. 93-98, 2001.
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr et al. Central nervous system control of food intake. **Nature.** v. 404, p. 661–671, 2000.
- Stopa ERS, de Souza CF, Martins AB 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, 111147, 2021.
- Stopa ERS, de Souza, CF, Santos GF et al. Sex differences in glucocorticoids-induced anabolic effects in rats. **Physiology & Behavior.** v. 209, 0031-9384, 2019.
- Suzuki, K. The developing world of DOHaD. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease.** v. 9, n. 3, p. 266-269, 2018. Velkoska E, Cole TJ, Morris MJ. Early dietary intervention: long-term effects on blood pressure, brain neuropeptide Y, and adiposity markers. **American Physiological Society.** v. 288, n. 6, p. 1236–1243, 2005.
- Velkoska E, Cole TJ, Dean RG et al. Early Undernutrition Leads to Long-Lasting Reductions in Body Weight and Adiposity Whereas Increased Intake Increases Cardiac Fibrosis in Male Rats. **The Journal of Nutrition.** v. 138, n. 9, p. 1622–1627, 2008.

- Vickers MH, Breier BH, Cutfield WS et al. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and post-natal amplification by hypercaloric nutrition. **Am J Physiol Endocrinol Metab.** v. 279, p. 83–87, 2000.
- Victora CG, Adair L, Fall C et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **Lancet.** v. 371, p.340–357, 2008.
- Wang X, Magkos F, Mittendorfer B. Sex differences in lipid and lipoprotein metabolism: it's not just about sex hormones. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 96, n. 4, p. 885-893, 2011.
- Woodall SM, Breier BH, Johnston BM, et al. A model of intrauterine growth retardation caused by chronic maternal undernutrition in the rat: effects on the somatotrophic axis and postnatal growth. **Journal of Endocrinology.** v. 150, n. 2, p. 231-242, 1996.
- Wood AR, Esko T, Yang J et al. Defining the role of common variation in the genomic and biological architecture of adult human height. **Nat Genet.** v. 46, n. 11, p. 1173–1186, 2014.
- Workicho A, Belachew T, Feyissa GT, et al. Household dietary diversity and Animal Source Food consumption in Ethiopia: Evidence from the 2011 Welfare Monitoring Survey. **BMC Public Health.** v. 16, n. 1, 2016.
- Yeh YY, Zee P, Owen GL et al. Effect of postnatal undernutrition on ketone metabolism and its relation to metabolic changes in brain and liver of rats. **The Journal of Nutrition.** v. 112, n. 6, p. 1162-1168, 1982.
- Zambrano E, Bautista CJ, Deas M et al. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation has sex-and window of exposure-specific effects on offspring growth and food intake, glucose metabolism and serum leptin in the rat. **The Journal of physiology.** v. 571, n. 1, p. 221-230, 2006.
- Zhu W, Tang S, Shen Z, et al. Growth hormone reverses dyslipidemia in adult offspring after maternal undernutrition. **Scientific Report.** v. 7, n. 1, 6038, 2017.

ANEXO A

Cópia do parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (UEL).



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

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 seus proles." protocolo CEUA nº 18310.2019.03 sob a responsabilidade do 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	Mãezes: 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, 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.


Prof. Dr.ª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Prof. Dr.ª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-3454

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