



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIELLY DUARTE AGUIAR BARBOSA

**EFEITOS DA SUBNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZIDA
POR EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA NOS
PARÂMETROS REPRODUTIVOS E METABÓLICOS DE
RATAS WISTAR**

DANIELLY DUARTE AGUIAR BARBOSA

**EFEITOS DA SUBNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZIDA POR
EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA NOS
PARÂMETROS REPRODUTIVOS E METABÓLICOS DE
RATAS WISTAR**

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

Orientador: Prof. Dr. Ernane Torres Uchôa

Londrina
2023

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

B238e Barbosa, Danielly Duarte Aguiar .
EFEITOS DA SUBNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZIDA POR EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA NOS PARÂMETROS REPRODUTIVOS E METABÓLICOS DE RATAS WISTAR / Danielly Duarte Aguiar Barbosa. - Londrina, 2023.
58 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, 2023.
Inclui bibliografia.

1. Subnutrição pós-natal - Tese. 2. Metabolismo e reprodução - Tese. 3. Comportamento sexual e comportamento materno - Tese. 4. DOHaD - Tese. I. Torres Uchôa, Ernane . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 612

DANIELLY DUARTE AGUIAR BARBOSA

**EFEITOS DA SUBNUTRIÇÃO NEONATAL INDUZIDA POR
EXPANSÃO DO TAMANHO DA NINHADA NOS
PARÂMETROS REPRODUTIVOS E METABÓLICOS DE
RATAS WISTAR**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Daniela C. Ceccato Gerardin
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Flavia Troncon Rosa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 03 de março de 2023.

Dedico este trabalho à minha filha Isabela. O seu nascimento foi o maior presente que o Senhor poderia nos dar. Através da maternidade o Senhor me aperfeiçoou e me capacitou para a vida, em todos os seus aspectos, inclusive para a realização deste trabalho. Você é bênção, Isabela!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, Ele que é a minha vida, a minha força, a minha capacidade, a minha energia, o meu descanso e o meu sustento. Agradeço a Ti Senhor, pois, apesar de todas as minhas limitações, o Senhor, de graça, tem me ensinado os princípios nobres e elevados da Sua Palavra e me capacitado para a vida! Toda honra e glória a Ti, Senhor!

Agradeço ao meu esposo, Juvenilson, por sempre me incentivar, me apoiar, me confortar e se alegrar com as minhas conquistas! Você é um presente do Senhor pra mim. Agradeço aos meus pais que sempre me incentivaram e estiveram dispostos a me ajudar em tudo! Vocês são parte disso!

Agradeço, de coração, as minhas amigas de laboratório. Obrigada por me acolherem e me ensinarem tudo o que vocês sabiam, obrigada por me ajudarem tanto! Vocês foram essenciais para realização desse trabalho, espero um dia poder retribuir!

Agradeço, especialmente, ao meu orientador, Dr. Ernane T. Uchôa. A sua empatia, paciência, incentivo e todo ensinamento foram essenciais para que eu conseguisse chegar até aqui e me fizeram enxergar o propósito de Deus para a minha vida! Você é inspiração!

Por fim, agradeço a todos os professores e colegas de outros laboratórios que contribuíram para a realização deste trabalho! Agradeço também às professoras que compõem a banca examinadora! Obrigada por terem aceitado contribuir para o aperfeiçoamento deste trabalho! Obrigada por compartilharem tanto conhecimento!

“Bendito seja o Teu glorioso Nome. A Tua majestade está acima das maiores expressões de louvor. Só Tu és Senhor! Criaste os céus e o universo, com todos os seus elementos, a terra e tudo quanto nela existe, os mares e tudo quanto neles há, e Tu concedes o dom da vida a todos os seres, e os exércitos dos céus Te adoram continuamente!” Neemias 9: 5, 6

Aguiar Barbosa, Danielly Duarte. **Efeitos da subnutrição neonatal induzida por expansão do tamanho da ninhada nos parâmetros reprodutivos e metabólicos de ratas Wistar.** 2023. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

RESUMO

A prevalência de subnutrição em âmbito mundial tem aumentado nos últimos anos, especialmente, devido ao encarecimento dos alimentos causado pela recente pandemia de COVID-19. Sabe-se que fatores ambientais nos quais os indivíduos são expostos no início da vida podem resultar em alterações no organismo que permanecem na vida adulta. Em roedores, as primeiras semanas pós-natais são um período de plasticidade hipotalâmica, crucial para o estabelecimento da homeostase energética e reprodutiva, sendo que complicações nutricionais durante esse período podem promover a programação do apetite, peso corporal, metabolismo energético e perfil reprodutivo do animal. A expansão do tamanho da ninhada é um modelo clássico de subnutrição neonatal cujas repercussões persistem até a idade adulta. Assim, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da subnutrição neonatal induzida pelo método de expansão do tamanho da ninhada em parâmetros reprodutivos e metabólicos de ratas, especialmente na idade adulta, já que existe uma lacuna na literatura a esse respeito. Ao nascimento, o tamanho da ninhada foi manipulado para formar ninhadas expandidas (LL - 16 filhotes) e normais (NL - 10 filhotes). A subnutrição neonatal resultou em menor peso corporal e distância nasoanal desde o desmame até a idade adulta, embora a ingestão alimentar tenha permanecido maior no grupo LL durante todo o período analisado. As ratas subnutridas exibiram atraso do início da puberdade, demonstrado pelo primeiro estro tardio, além de valores aumentados de estradiol circulante e número de folículos antrais nos ovários, associado a maior receptividade sexual, sem diferenças significativas, no entanto, no comportamento materno. Dessa forma, concluímos que, a subnutrição moderada no período lactacional promove alterações metabólicas e reprodutivas na vida adulta de ratas.

Palavras-chave: DOHAD, subnutrição pós-natal, homeostase energética, estradiol e comportamento sexual.

Aguiar Barbosa, Danielly Duarte. **Effects of litter size expansion-induced neonatal undernutrition on reproductive and metabolic parameters in female rats.** 2023. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2023.

ABSTRACT

The prevalence of undernutrition worldwide has increased in recent years, especially due to the rise in food prices caused by the recent COVID-19 pandemic. It is known that environmental factors to which individuals are exposed in early life can result in changes in the organism that remain in adult life. In rodents, the first postnatal weeks are a period of hypothalamic plasticity, crucial for the establishment of energy and reproductive homeostasis, and nutritional complications during this period can promote the programming of appetite, body weight, energy metabolism and reproductive profile of the animal. The expansion of litter size is a classic model of neonatal undernutrition whose repercussions persist into adulthood. Thus, this study aimed to evaluate the effects of neonatal undernutrition induced by the litter size expansion method on reproductive and metabolic parameters of female rats, especially in adulthood, since there is a gap in the literature in this issue. At birth, litter size was adjusted to form large (LL - 16 pups) and normal (NL - 10 pups) litters. Neonatal undernutrition resulted in lower body weight and nasoanal distance from weaning to adulthood, although food intake remained higher in the LL group throughout the analyzed period. Undernourished female rats exhibited delayed onset of puberty, demonstrated by a late first estrus, in addition to increased values of circulating estradiol and number of antral follicles in the ovaries, associated with higher sexual receptivity, without differences in maternal behavior. Thus, we conclude that moderate undernutrition in the lactational period promotes metabolic and reproductive changes in adult female rats.

Keywords: DOHAD, postnatal undernutrition, energy homeostasis, estradiol and sexual behavior.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Perfil hormonal das concentrações circulantes de LH, FSH, prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de ratas22
- Figura 2** - Desenho experimental dos protocolos 1 e 228
- Figura 3** - (A) Curva de peso (g); (B) área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar (g/100g de peso) do DPN 25 ao 90; (C) distância nasoanal (cm); (D) índice de Lee (g1/3/cm); (E) peso de tecido adiposo perigonadal + perirrenal (g/100 g); (F) tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g) de ratas de ninhadas normais (NL) e ninhadas expandidas (LL)34
- Figura 4** - (A) Glicemia após teste oral de tolerância à glicose (oGTT; mg/dL); (B) área sob a curva (AUC) de OGTT de 0 a 120 min (mg/dL); (C) valores plasmáticos de triglicérides (mg/dL); (D) colesterol total (mg/dL); (E) ácidos graxos livres (μ moles/dL); e, (F) estradiol (pg/mL) de ratas de ninhadas normais (NL) e ninhadas expandidas (LL)35
- Figura 5** - (A) Número de folículos antrais; (B) número de folículos primários; (C) número de folículos em crescimento de ratas de ninhadas normais (NL) e expandidas (LL) e fotomicrografias representativas dos folículos antrais dos ovários de ratas de ninhadas normais (D) e expandidas (E), representadas pelas setas37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Abertura vaginal (dia pós-natal - DPN), primeiro estro (DPN), início da ciclicidade (DPN), duração do ciclo (dias), coeficiente de proestro (%), coeficiente de estro (%) e coeficientes de metaestro e diestro (%) de ratas de ninhadas normais (NL) e expandidas (LL)	36
Tabela 2 - Coeficiente de lordose ($LQ = n^{\circ}$ de posturas de lordose/montagens totais x 100), escore de lordose (n° total da pontuação de lordose/ n° total de respostas de lordose) e magnitude de lordose (classificada em uma escala de 0 a 3, onde 0 é a ausência de lordose e 3 é a lordose máxima) de ratas de ninhadas normais (NL) e expandidas (LL)	38
Tabela 3 - Parâmetros do comportamento materno da geração F0	40
Tabela 4 - Interação entre o tempo e grupo, o efeito do tempo e grupo da análise de medidas repetidas ANOVA do comportamento materno da geração F0	41
Tabela 5 - Parâmetros do comportamento materno da geração F1	43
Tabela 6 - Interação entre o tempo e grupo, o efeito do tempo e grupo da análise de medidas repetidas ANOVA do comportamento materno da geração F1	44
Tabela 7 - Número de corpos lúteos, número de fetos vivos, taxa de implantação (%), taxa de perda pré-implantação (%), taxa de perda pós-implantação (%) e taxa de viabilidade fetal (%) de ratas normais (NL) e ninhadas grandes (LL). O número de animais é mostrado entre parênteses	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AgRP** - Proteína relacionada ao Agouti
- ARC** - Núcleo arqueado do hipotálamo
- AUC** - Área sob a curva
- CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação
- CIF** - Departamento de Ciências Fisiológicas
- DL** - Dia lactacional
- DPN** - Dia pós-natal
- ER α** - Receptor para estrógenos
- FSH** - Hormônio folículo estimulante
- F0** - Matrizes de ninhadas NL e LL
- F1** - Ninhadas NL e LL
- F2** - Prole das ninhadas NL e LL
- GABA** - Ácido gama aminobutírico
- GLUT 4** - receptor de glicose
- GnRH** - Hormônio liberador de gonadotrofina
- HDL** - Lipoproteínas de densidade alta
- Kiss1** - Gene que expressa kisspeptina
- LDL** - lipoproteínas de densidade baixa
- LH** - Hormônio luteinizante
- LL** - Ninhada expandida
- LQ** - Coeficiente de lordose
- mRNA** - RNA mensageiro
- NAG** - Neurônios que expressam NPY/AgRP/GABA
- NL** - Ninhada normal
- NPY** - Neuropeptídeo Y
- OGTT** - Teste oral de tolerância à glicose
- PVN** - Núcleo paraventricular do hipotálamo

SEM - Erro padrão da média

TRH - Hormônio liberador de tireotrofina

TSH - Tireotrofina

UEL - Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
	1.1 Efeitos da subnutrição em parâmetros metabólicos	17
	1.2 Efeitos da subnutrição no sistema reprodutor e eixo hipotálamo-hipófise-gonadal	18
	1.3 Ciclo estral	21
	1.4 Comportamento sexual	22
	1.5 Comportamento materno	23
2.	JUSTIFICATIVA	25
3.	OBJETIVOS	25
	3.1 Objetivo geral	25
	3.2 Objetivos específicos	25
4.	METODOLOGIA	26
	4.1 Animais	26
	4.2 Protocolo experimental 1	27
	4.3 Protocolo experimental 2	27
	4.4 Detalhamento metodológico	28
	4.4.1 Ciclo estral	28
	4.4.2 Índice de Lee	29
	4.4.3 Teste oral de tolerância à glicose	29
	4.4.4 Avaliação do comportamento sexual	29
	4.4.5 Coleta de sangue e dosagens plasmáticas	30
	4.4.6 Análise de fertilidade	30
	4.4.7 Análise histológica dos ovários	31
	4.4.8 Análise do comportamento materno	31
	4.5 Análise estatística	31
5.	RESULTADOS	33
	5.1 Parâmetros metabólicos das ratas nulíparas	33
	5.2 Parâmetros reprodutivos e comportamento sexual das ratas nulíparas	36
	5.3 Comportamento materno geração F0	38
	5.4 Comportamento materno geração F1	42
	5.5 Análise de fertilidade	45
6.	DISCUSSÃO	46

7.	CONCLUSÃO	50
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2023), a subnutrição é uma condição decorrente da incapacidade de se adquirir alimentos de forma suficiente para atender às necessidades diárias mínimas de energia dietética a fim de manter uma vida normal, ativa e saudável. A prevalência de subnutrição mundial tem aumentado nos últimos anos, especialmente devido ao encarecimento dos alimentos causado pela pandemia de COVID-19. Os dados revelam que o número de indivíduos subnutridos saltou de 618,4 (8%) milhões em 2019 para 721,7 (9,3%) milhões em 2020 (FAO, 2022).

Já está bem consolidado na literatura científica, por meio de estudos epidemiológicos e modelos animais, que alterações nutricionais precoces, nos períodos intrauterino e neonatal, modificam a programação metabólica e podem predispor os descendentes ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (PLAGEMANN, 2008; VICTORA et al., 2008; PRIOR, 2008). É o que chamamos de DOHaD, Origem Desenvolvimentista da Saúde e da Doença, uma área do conhecimento científico que têm acumulado evidências, ao longo dos últimos anos, sobre a influência dos fatores ambientais aos quais os indivíduos são expostos no início da vida na expressão genética, determinando um padrão de saúde-doença específico na idade adulta e/ou nas próximas gerações (SILVEIRA, 2007).

Em seres humanos, o menor peso ao nascer e a nutrição insuficiente na infância são fatores de risco para altas concentrações de glicose, hipertensão, dislipidemias e menor estatura na idade adulta, e em mulheres está relacionada com menor quantidade de descendentes e filhos com menor peso ao nascer (VICTORA et al., 2008).

Na experimentação, são vários os modelos animais utilizados para se induzir a subnutrição, dentre eles destaca-se a restrição calórica/proteica materna durante prenhez, restrição calórica/proteica materna durante a lactação e expansão do tamanho da ninhada. Vale ressaltar que os resultados da subnutrição nos estágios iniciais do desenvolvimento são controversos, diferindo de acordo com o tipo, duração e severidade da restrição (PICÓ, 2012).

A restrição calórica/proteica materna durante a prenhez é associada ao aumento da ingestão alimentar da prole, rápida recuperação de peso, maior tendência ao desenvolvimento de obesidade, especialmente quando expostos a um ambiente obesogênico e elevação dos valores plasmáticos de insulina. Importante ressaltar que tais alterações metabólicas são mais acentuadas em machos do que em fêmeas (VICKERS et al, 2000; DESAI et al., 2005; PALOU et al., 2010).

Já na restrição calórica/proteica materna durante a lactação os animais possuem menor peso no desmame, podendo haver recuperação do peso após o desmame ou não, ainda que esses

animais possuam maior ingestão alimentar. Além disso, a restrição calórica/proteica materna moderada durante a lactação tem sido associada a melhora da sensibilidade a insulina da prole na vida adulta (ŠEFČÍKOVÁ; MOZEŠ, 2002; PALOU et al., 2010b).

Resultados semelhantes podem ser observados na subnutrição induzida por expansão do tamanho da ninhada, em que os animais permanecem com menor peso até a idade adulta, possuem maior sensibilidade à insulina e valores plasmáticos reduzidos de triglicérides, sendo a subnutrição fator de proteção contra o desenvolvimento de obesidade (LÓPEZ-SOLDADO et al., 2006; PRIOR, 2008; REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008; PATTERSON et al., 2010).

O método de expansão do tamanho da ninhada tem sido classicamente utilizado, visando avaliar os efeitos da subnutrição nos estágios iniciais do desenvolvimento. Nesse modelo, ocorre manipulação do tamanho da ninhada após o nascimento, formando ninhadas maiores (com 14 a 24 filhotes; LL – do inglês, *large litter*) (CODD; CARLIN, 1971) do que o habitual (controle – NL, do inglês, *normal litter*), que tem de dez 10 a 12 filhotes (CHERNOFF et al., 2009). A maior quantidade de filhotes resulta na redução do acesso ao leite materno per capita, além de alterar a composição do leite que passa a ter uma diminuição na quantidade de lipídeos, e dessa forma, os animais de ninhada expandida têm oferta reduzida de nutrientes (YEH et al., 1982; FIOROTTO et al., 1991; LÓPEZ-SOLDADO et al., 2006; REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008).

Em roedores, o período de lactação é especialmente decisivo para o desenvolvimento do organismo, sendo que mudanças nutricionais nesta fase podem promover alterações metabólicas e reprodutivas do animal (ZAMBRANO et al., 2006; PRIOR, 2008; REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008; CARON et al., 2012), visto que nesse período existe uma janela de plasticidade, em que o organismo ainda pode se desenvolver em diferentes direções, ou seja, o organismo em desenvolvimento possui grande potencial para se adaptar ao seu ambiente. Quando a janela de plasticidade se fecha, muitas dessas adaptações se tornam permanentes (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

Sabe-se que para se programar um determinado sistema ou função, o estímulo do ambiente deve ocorrer durante o período de desenvolvimento, quando ainda existe plasticidade. Em roedores, a regulação do balanço energético ainda é funcionalmente e estruturalmente imatura no início da vida pós-natal. Neste contexto, o hipotálamo, responsável pelo controle de diversos processos fisiológicos desde o controle da temperatura corporal e ingestão alimentar até o controle da função endócrina e reprodutiva, possui neurônios sensíveis à variação na disponibilidade de nutrientes, podendo ter sua atividade alterada em decorrência

de mudanças no ambiente nutricional (AIRES, 2008; CURI, PROCÓPIO, 2017). Embora o hipotálamo já esteja basicamente formado antes do nascimento, é somente no período pós-natal, nas primeiras semanas de vida, que a maior parte das conexões entre o hipotálamo e seus sistemas de entrada e saída se estabelecem (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011).

Modelos em que roedores são submetidos a complicações nutricionais durante o início da vida pós-natal foram propostos para mimetizar condições de perturbação metabólica durante o final da gestação em humanos, já que muitos eventos do desenvolvimento de roedores que ocorrem no início do período pós-natal, em humanos sucedem no terceiro trimestre de gestação. Conseqüentemente, modelos de manipulação nutricional em ratos durante a lactação são, provavelmente, mais apropriados para analisar condições de má programação neuro-hormonal (CASTELLANO, 2011).

1.1 Efeitos da subnutrição em parâmetros metabólicos

Em roedores, as vias neurais que regulam a ingestão de alimentos são progressivamente estabelecidas durante o período pós-natal imediato, entre os dias 6 e 16. O desenvolvimento dessas vias ocorre no mesmo momento em que há um aumento dramático dos valores plasmáticos de leptina. Os valores elevados de leptina não resultam em inibição da ingestão alimentar, mas exercem função essencial na organização das vias hipotalâmicas (DJIANE; ATTIG, 2008).

Além disso, a subnutrição pós-natal atrasa a maturação dos sistemas inibitórios pré-sinápticos e pós-sinápticos em neurônios orexigênicos NPY (*Neuropeptide Y* - Neuropeptídeo Y) / AgRP (*Agouti-Related Peptide* - Proteína Relacionada ao Agouti) / GABA (*Gamma-Aminobutyric Acid* - Ácido Gama Aminobutírico) (NAG) no núcleo arqueado do hipotálamo (DE SOLIS et al., 2016). O NPY e a AgRP são peptídeos orexígenos que agem inibindo a melanocortina, um anorexígeno, estimulando, conseqüentemente, a ingestão alimentar. Dessa forma, suas concentrações hipotalâmicas aumentam durante o jejum e diminuem após a refeição (KORNER et al., 2001; TAKAHASHI; CONE, 2005; MMI, 2017).

Os neurônios NAG exercem importante função na regulação homeostática da ingestão alimentar. São ativados por sinais de balanço energético negativo, como a grelina, e são inibidos por sinais circulantes que indicam um balanço energético positivo, como a leptina. Visto que projeções de neurônios NAG que regulam a ingestão de alimentos são formadas durante o período de lactação, é possível que o atraso na maturação desse sistema esteja

associado a impactos na sinalização da leptina nos neurônios NAG (DE SOLIS et al., 2016), sendo que Remmers e colaboradores (2008) já demonstraram anteriormente que animais de ninhada expandida possuem menores valores plasmáticos desse hormônio. Além disso, animais subnutridos no período pós-natal apresentam um aumento das projeções de neurônios NAG na terceira e quarta semana de vida, e o resultado é um aumento do impulso orexígeno após o desmame (DE SOLIS et al., 2016).

Sabe-se que neurônios que expressam NPY no núcleo arqueado hipotalâmico (ARC) se projetam para o núcleo paraventricular (PVN), e que a insulina e leptina inibem a expressão e a liberação do NPY, enquanto a diminuição das concentrações de insulina e leptina e ativam o sistema NPY, estimulando a ingestão de alimentos (SCHWARTZ et al., 2000; PLAGEMANN, 2006).

Além de atuar na regulação da ingestão alimentar, a leptina também age no controle do gasto energético através do eixo hipotálamo-hipófise-tireoide. A leptina estimula a expressão de TRH (Hormônio liberador de tireotrofina) no hipotálamo e age diretamente sobre a hipófise regulando a liberação do TSH (Tireotrofina) (LISBOA et al., 2011). Dados revelam que a restrição proteica materna durante o período de lactação pode causar disfunção na glândula tireoide, resultando em elevação dos valores plasmáticos dos hormônios tireoidianos (PASSOS et al., 2002). Dessa forma a restrição proteica neonatal programa os animais a permanecerem com menor peso e também desenvolvimento de hipertireoidismo associado à redução acentuada no tamanho dos adipócitos viscerais e subcutâneos, sugerindo que o estado de hipertireoidismo desses animais pode ser um fator importante para o menor armazenamento de lipídios (LISBOA et al., 2011).

Ratos submetidos à subnutrição neonatal por expansão do tamanho da ninhada apresentam baixo peso, são hipoinsulinêmicos e possuem valores reduzidos de leptina (PLAGEMANN, 2006). No entanto, apesar de serem hipoinsulinêmicos, os níveis glicêmicos não diferem do grupo controle sugerindo um aumento da sensibilidade à ação da insulina nesses animais (WATERLAND; GARZA, 2002).

1.2 Efeitos da subnutrição no sistema reprodutor e eixo hipotálamo-hipófise-gonadal

Evidências sugerem que parâmetros reprodutivos também podem ser influenciados pela subnutrição no início do desenvolvimento. Em modelos em que a subnutrição é induzida no período intrauterino por restrição calórica/proteica materna, a prole feminina apresenta redução no número de folículos primordiais, secundários e antrais na idade adulta (BERNAL, 2010).

Além disso, essas fêmeas apresentam atraso no início da puberdade, demonstrado por abertura vaginal e primeiro estro tardios (ENGELBREGT et al., 2002).

A gestação é uma janela crítica de vulnerabilidade ovariana fetal, sendo que a prole de mães subnutridas durante a prenhez e lactação ou apenas durante a prenhez, mas não apenas durante a lactação, demonstraram perda de fatores de crescimento folicular derivados do ovócito, bem como aumento dos níveis de estresse oxidativo (BERNAL, 2010; CHAN et al., 2015). Assim, a subnutrição pós-natal induzida por restrição calórica/proteica materna no período da lactação não resulta em prejuízos no perfil folicular da prole (ENGELBREGT et al., 2002) ou possui menores repercussões do que a subnutrição no período intrauterino (BERNAL, 2010).

Já no modelo de subnutrição pós-natal induzida pelo método de expansão do tamanho da ninhada, as fêmeas apresentam atraso no início da puberdade, pela abertura vaginal e primeiro estro tardios e menor peso dos ovários e útero no período peripuberal (CASTELLANO et al., 2011; CARON et al., 2012). No entanto, existe uma lacuna na literatura em relação ao efeito da subnutrição neonatal pelo método de expansão do tamanho da ninhada no perfil folicular, nos valores plasmáticos de estradiol, ciclicidade e fertilidade em ratas adultas.

A puberdade é o processo no qual um indivíduo se torna sexualmente maduro, com o desenvolvimento das características sexuais secundárias a partir do aumento gradual e progressivo da atividade das gônadas, sendo esse processo regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O início da puberdade decorre de mecanismos neuronais complexos e é essencialmente dependente da liberação pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (*gonadotropin-releasing hormone* – GnRH) (LIVADAS; CHROUSOS, 2016).

A Kisspeptina é um neuropeptídeo chave para o início da puberdade. O aumento da liberação de kisspeptina durante esse período resulta no aumento da liberação pulsátil de GnRH no sistema porta da eminência mediana, que age em células da hipófise conhecidas como gonadotrofos. Nos gonadotrofos, o GnRH controla a liberação pulsátil das gonadotrofinas, o hormônio folículo estimulante (FSH) e o hormônio luteinizante (LH), hormônios que regulam a função gonadal, estimulando a produção de estradiol e progesterona (TERASAWA; GUERRIERO; PLANT, 2013; HERBISON, 2016).

Durante a infância, as células somáticas das gônadas, responsáveis pela gametogênese, são incapazes de responder totalmente a estimulação de gonadotrofinas, além de que, existe a supressão da liberação pulsátil de GnRH. Como resultado, as gônadas permanecem em estado de quiescência até o início do desenvolvimento puberal (PLANT, 2015).

Embora no nascimento parte dos neurônios GnRH já possuam receptores para kisspeptina, é próximo ao início da puberdade, que a quantidade de neurônios GnRH com receptores para kisspeptina aumenta, bem como o número de neurônios kisspeptina no núcleo periventricular anteroventral. Logo, durante a puberdade os neurônios GnRH são mais sensíveis ao estímulo por kisspeptina (CLARKSON et al., 2010).

O FSH e o LH são responsáveis pela foliculogênese e secreção de estradiol. O FSH estimula o crescimento e maturação dos folículos ovarianos e a síntese de estrógenos, pelas células da granulosa, entre outras funções. O LH atua em conjunto com o FSH durante o período de desenvolvimento dos folículos. Os receptores de LH são encontrados predominantemente nas células da teca. Nessas células o LH induz a síntese de androgênios, que se difundem até as células da granulosa. Na granulosa os androgênios são convertidos em estrogênios sob ação do FSH que estimula síntese de aromatase, enzima responsável pela conversão de testosterona em estradiol (AIRES, 2008). A produção crescente de estradiol pelos folículos conduz a um pico desse estrogênio, e, como resultado, ocorre uma grande onda de liberação de GnRH e consequente pico de liberação de LH, culminando na ovulação. A interrupção deste circuito pode levar a atrasos ou ausência de puberdade e função reprodutiva prejudicada, por exemplo. (TERASAWA; GUERRIERO; PLANT, 2013).

Sabe-se que os neurônios Kiss1 hipotalâmicos são altamente sensíveis ao estado nutricional do organismo e aos sinais metabólicos, sendo que em condições de balanço energético negativo, existe uma supressão da expressão de Kiss1/kisspeptina, o que também está ligado à inibição do eixo reprodutivo (ROA et al., 2010).

Além das funções desempenhadas no sistema reprodutor, o estradiol desempenha papéis em outros sistemas, de modo que receptores para estradiol são expressos em células endoteliais, onde os estrogênios atuam induzindo aumento de óxido nítrico e consequente vasodilatação. Esses hormônios alteram distribuição do tecido adiposo contribuindo para deposição de tecido adiposo na região dos quadris e das mamas, e modificam o metabolismo de lipídeos promovendo a elevação de lipoproteínas de densidade alta (HDL) e de triglicerídeos, diminuição do colesterol e de lipoproteínas de densidade baixa (LDL) (AIRES, 2008). Além disso, o estradiol possui efeitos protetores contra o desenvolvimento de resistência à insulina. Os estrógenos regulam a expressão do receptor de glicose GLUT 4 nos músculos através do receptor ER α , tendo influência na sensibilidade à insulina (BARROS et al., 2006).

1.3 Ciclo estral

Em roedores, o ciclo estral dura entre 4 e 5 dias e cada fase é caracterizada pelo tipo celular predominante, já que, durante o ciclo, os tipos celulares se alteram refletindo as concentrações circulantes de estradiol e progesterona. O ciclo estral é dividido em 4 fases, proestro; estro; metaestro e diestro, sendo o proestro caracterizado pela predominância de células epiteliais nucleadas pequenas, redondas e de tamanho uniforme. O estro é caracterizado pela presença de células queratinizadas e anucleadas; no metaestro estão presentes células anucleadas e leucócitos, principalmente, e pequenas quantidades de células nucleadas. Já no diestro, a fase mais longa do ciclo, os leucócitos estão presentes em maior quantidade (CORA, KOOISTRA, TRAVLOS, 2015).

Os valores plasmáticos de LH e FSH permanecem baixos durante o ciclo estral, elevando-se até seu pico apenas na tarde de proestro. As concentrações de LH retornam a concentrações basais na manhã do estro. Já o FSH alcança um segundo pico na manhã do estro, retornando a valores basais apenas na noite do estro. No início do diestro, as concentrações de estradiol começam a aumentar, alcançando o pico durante o proestro e voltando a valores basais no estro. As concentrações de progesterona alcançam seu pico de liberação também durante o proestro, retornando a valores basais apenas no início do estro. No entanto, sua concentração volta a subir no diestro, devido à produção pelo corpo lúteo, que se degenera antes que a fase do diestro termine e conseqüentemente, os valores de progesterona caem novamente (Figura 1) (SMITH, FREEMAN, NEILL, 1975).

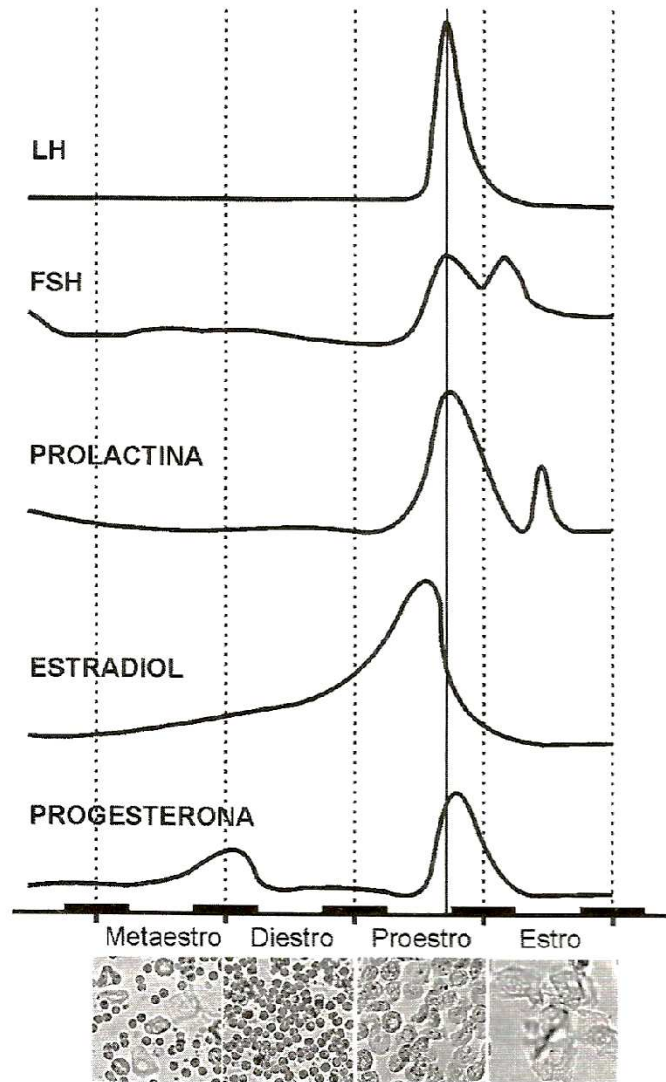


Figura 1. Perfil hormonal das concentrações circulantes de LH, FSH, prolactina, estradiol e progesterona durante o ciclo estral de ratas. Na parte inferior da figura, estão apresentadas fotomicrografias de esfregaços vaginais característicos de cada fase do ciclo estral (ANSELMO-FRANCI, SZAWKA, 2005).

1.4 Comportamento sexual

O comportamento sexual em ratas envolve o comportamento receptivo, expresso pela postura de lordose que é caracterizada pela posição imóvel e a flexão dorsal das costas da rata em resposta à monta de um rato. A lordose facilita a penetração do macho e fertilização e reflete a disposição da fêmea de se engajar no acasalamento. As fêmeas apresentam lordose somente quando estão em estro, coincidindo com a ovulação (GUARRACI; BOLTON, 2014; HELLIER; BROCK; BAKKER, 2019).

Os hormônios ovarianos estradiol e progesterona desempenham papel crucial na expressão do comportamento sexual de ratas. Enquanto o estrogênio sozinho é capaz de iniciar a receptividade das fêmeas ao macho durante o estro, a progesterona age facilitando o processo. O período de receptividade sexual dura aproximadamente 14 horas e o fim desse período coincide com a diminuição das concentrações plasmáticas de estrogênio. O estrogênio secretado durante as 24-36 horas que precedem o início da receptividade em fêmeas intactas provavelmente exerce o controle mais importante sobre o período de tempo durante o qual o estro comportamental pode ser exibido. Ratas ovariectomizadas exibem comportamento sexual positivo quando são tratadas apenas estradiol, ou seja, o estradiol sozinho é capaz de provocar lordose, sendo que a intensidade da resposta é dose-dependente, no entanto a administração de progesterona aumenta a efetividade do estradiol (POWERS, 1970; ZEMLAN, ADLER, 1977).

Em ratas ovariectomizadas, a administração de progesterona após 24 a 48 horas da administração de estradiol aumenta a intensidade/grau de lordose apresentado pelas fêmeas. A liberação hormonal endógena durante o ciclo estral desses animais segue uma lógica semelhante, sendo que a secreção de progesterona pelos folículos de Graaf aumenta cerca de 24 horas após o início do aumento de estradiol, e, coincide com o início do comportamento sexual na fase estro, demonstrado pela presença de lordose diante de estímulo genital, seguido pela ovulação no final do estro (FEDER; RESKO; GOY, 1968; FEDER; MARRONE, 1977).

Além disso, a estimulação perineal em ratas, que ocorre antes da penetração, durante impulso copulatório pelo macho e é dependente de estrogênio, tem um papel importante na facilitação do reflexo da lordose. O tratamento com estrogênio em ratas ovariectomizadas resulta em aumento do campo sensorial do nervo pudendo (estende-se da base da bainha do clitóris até a base da cauda em na linha média e lateralmente ao longo da face interna da coxa), aumentando a sensibilidade do períneo em ratas (KOMISARUK; ADLER; HUTCHISON, 1972).

1.5 Comportamento materno

Sabe-se que a resposta materna é fundamental para a sobrevivência do filhote. Em ratas o comportamento materno é iniciado a partir da diminuição gradual dos valores plasmáticos de progesterona no meio da gestação e elevação dos valores plasmáticos de estradiol e prolactina, sendo que após o nascimento, a responsividade materna depende, principalmente, do contato com o filhote e a percepção de suas necessidades (ROSENBLATT; MAYER; GIORDANO, 1988).

Os principais componentes do comportamento materno em ratos são a recuperação dos filhotes, construção do ninho, amamentação e lambar os filhotes. (NUMAN; INSEL, 2003 apud NUMAN, 2007). Em roedores, variações no comportamento materno servem de base para a transmissão de diferenças individuais nas respostas ao estresse da mãe para a prole (WEAVER et al., 2004).

O pico de cuidado materno ocorre nos primeiros dias após o nascimento e vai diminuindo gradualmente, dessa forma, só é possível avaliar fidedignamente variações no comportamento nesse período inicial (CHAMPAGNE et al., 2003).

Estudos têm demonstrado que o ambiente nutricional no período perinatal exerce grande influência na expressão do comportamento materno de ratas. A subnutrição induzida por restrição calórica/proteica materna no período intrauterino resulta em alterações hipotalâmicas na prole que permanecem em longo prazo prejudicando a resposta materna desses animais. As alterações no comportamento materno incluem redução no tempo destinado a construção do ninho e a lambar os filhotes (SALCEDO et al., 2018), retardo na recuperação do primeiro filhote, menor tempo amamentando em cifo (FELIX et al., 2014).

Embora vários estudos tenham analisado os efeitos da subnutrição intrauterina e neonatal no sistema reprodutor de fêmeas, não existem, ao que se sabe, dados que demonstrem o efeito da subnutrição pós-natal pelo método de expansão do tamanho da ninhada na expressão do comportamento sexual e materno desses animais.

2. JUSTIFICATIVA

Dessa forma, visto que a subnutrição nas fases iniciais do desenvolvimento é capaz de programar o metabolismo energético com repercussões até a vida adulta, que a programação metabólica pode promover alterações no perfil reprodutivo, e que não há dados na literatura, até o que se sabe, sobre os efeitos da subnutrição lactacional induzida pela expansão na ninhada nas respostas metabólicas e reprodutivas de fêmeas adultas, torna-se relevante avaliar se as alterações metabólicas, decorrentes da expansão do tamanho da ninhada, permanecem quando os animais possuem livre acesso à alimentação, se são prejudiciais ou não, e se poderiam influenciar o perfil reprodutivo de ratas Wistar adultas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar parâmetros metabólicos e reprodutivos de ratas de ninhadas normais e ratas submetidas à subnutrição neonatal por expansão do tamanho da ninhada.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar os seguintes parâmetros de ratas de ninhada normal e expandida:

- a) Parâmetros biométricos, pela avaliação do ganho de peso corporal, ingestão alimentar, peso de tecido adiposo branco visceral e adrenais, distância nasoanal e Índice de Lee;
- b) Perfil lipídico (ácidos graxos livres, triglicérides e colesterol total) e tolerância à glicose;
- c) Perfil reprodutivo pela avaliação do início da puberdade, a partir da ocorrência da abertura vaginal e primeiro estro, ciclicidade, bem como peso de útero e ovários, histologia de ovários, concentrações plasmáticas de estradiol e comportamento sexual;
- d) Comportamento materno da geração F0 e F1;
- e) Taxas de fertilidade de ratas primigestas.

4. METODOLOGIA

4.1 Animais

Foram utilizadas ratas da linhagem Wistar (Geração F1) obtidas por meio de cruzamento de matrizes (Geração F0 - 22 fêmeas e 10 machos) provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL), ou seja, as ratas utilizadas neste estudo foram denominadas de geração F1, ao passo que, suas progenitoras ou mães, denominadas geração F0. Para o cruzamento, cada fêmea de F0 foi mantida com um macho durante uma noite. A prenhez foi determinada pela análise de esfregaço vaginal e observação da presença de espermatozoides.

No início da última semana de gestação, cada rata foi colocada em uma caixa individual. Após o nascimento, as ninhadas F1 foram ajustadas para formar ninhadas normais (*Normal Litter*, NL – 10 filhotes para cada fêmea) e ninhadas expandidas (*Large Litter*, LL – 16 filhotes para cada fêmea) (LÓPEZ-SOLDADO; MUNILLA; HERRERA, 2006), sendo as NL compostas por 5 filhotes machos e 5 filhotes fêmeas e as LL por 8 filhotes machos e 8 filhotes fêmeas. Quando necessário, foi utilizado o método de *cross fostering* (transferência de filhotes entre diferentes mães), para esse ajuste do tamanho da ninhada. A partir do cruzamento das matrizes foram formadas 7 ninhadas normais e 4 ninhadas expandidas, totalizando 35 fêmeas de ninhada normal e 32 fêmeas de ninhada expandida, que foram utilizadas nos protocolos 1 e 2. Após o desmame, realizado no dia pós-natal 21, os filhotes machos obtidos concomitantemente às fêmeas utilizadas neste estudo foram destinados para outro projeto.

Os animais utilizados nos protocolos experimentais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF), com ambiente de luz (ciclo 12 h claro/escuro) e temperatura (22 ± 2 °C) controladas, e água e alimentação à vontade, exceto nos experimentos que envolveram restrição alimentar, como detalhado adiante. Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Fisiologia Neuroendócrina e Metabolismo do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina (CIF/UEL), a partir das 14h, na tarde do proestro. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em experimentação (protocolo CEUA nº 18310.2019.03, OF. CEUA nº164/2019 – ANEXO A).

4.2 Protocolo experimental 1 – Avaliação do efeito da subnutrição pós-natal induzida por expansão do tamanho de ninhada na ingestão alimentar, peso corporal, peso de tecido adiposo branco, útero, ovários e adrenais, perfil lipídico e parâmetros reprodutivos de fêmeas de ninhada normal e expandida.

No dia do nascimento de F1 (dia pós-natal 0 – DPN 0), realizou-se a manipulação do tamanho da ninhada, seguida da aferição de peso. Foi realizada análise do comportamento materno da geração F0 nos dias lactacionais (DL) 5 e 10. O peso dos animais também foi verificado nos DPN 3, 7, 10, 14, 17 e 21, sendo que no desmame (DPN 21), além do peso, mediu-se o comprimento nasoanal, para o cálculo do índice de Lee. Após o desmame, os animais foram pesados e tiveram sua ingestão alimentar avaliada a cada 5 dias, até o DPN 90. A partir do DPN 21, teve início a observação da abertura vaginal, e a partir de sua ocorrência, foi realizado esfregaço vaginal diário para verificação do primeiro estro, bem como o tempo de regularização do ciclo estral. Até o DPN 70, foram realizados os mesmos procedimentos em todas as fêmeas. No DPN 70, os animais foram divididos em 2 grupos, sendo 35 fêmeas (19 NL e 16 LL) destinadas ao protocolo 1, e 26 fêmeas (14 NL e 12 LL) destinadas ao protocolo 2. Do DPN 75 até o DPN 90, além da aferição do peso e ingestão alimentar, avaliou-se a ciclicidade estral das fêmeas por meio de esfregaço vaginal diário nas 35 fêmeas destinadas ao protocolo 1. No DPN 90, novamente aferiu-se o comprimento nasoanal para o cálculo do índice de Lee na idade adulta. Após o DPN 90, estando a fêmea em proestro, foi submetida à restrição alimentar de 6 horas e eutanásia por decapitação às 14h. Após a eutanásia, o sangue foi coletado para avaliação das concentrações plasmáticas de estradiol, ácidos graxos, triglicérides e colesterol total. Os tecidos adiposos viscerais retroperitoneal e perigonadal, bem como as adrenais, ovários e útero foram retirados e pesados, sendo os ovários utilizados para análise histológica.

4.3 Protocolo experimental 2 – Avaliação do efeito da subnutrição pós-natal induzida por expansão do tamanho de ninhada no comportamento sexual, comportamento materno e análise de fertilidade de fêmeas de ninhada normal e expandida.

Do DPN 0 ao 69, as fêmeas F1 foram submetidas aos mesmos procedimentos do protocolo 1, como detalhado acima. A partir do DPN 70, as 26 fêmeas destinadas ao protocolo 2, quando em proestro, foram mantidas em restrição alimentar das 08h às 14h, para a realização do teste oral de tolerância à glicose (*Oral glucose tolerance test* – OGTT). Do DPN 75 ao DPN 90, as ratas permaneceram em um biotério com ciclo claro/escuro de 12×12 horas invertido, com controle de luminosidade, ruído e temperatura, para adaptação das funções fisiológicas. A

partir do DPN 90, estando a fêmea receptiva ao macho, foi realizada a análise do comportamento sexual. Após o comportamento sexual, as fêmeas foram consideradas prenhas pela observação da cópula. Após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 8 filhotes (geração F2 – 4 machos e 4 fêmeas) por fêmea, sendo realizada análise do comportamento materno da geração F1 nos DL 5 e 10. No DL 21, foi realizado o desmame da geração F2 e as mães (geração F1) submetidas à eutanásia para análise da fertilidade. Os animais da geração F2 foram destinados para outro projeto do mesmo laboratório de pesquisa. O desenho experimental do protocolo 1 e 2 está representado na figura 2.

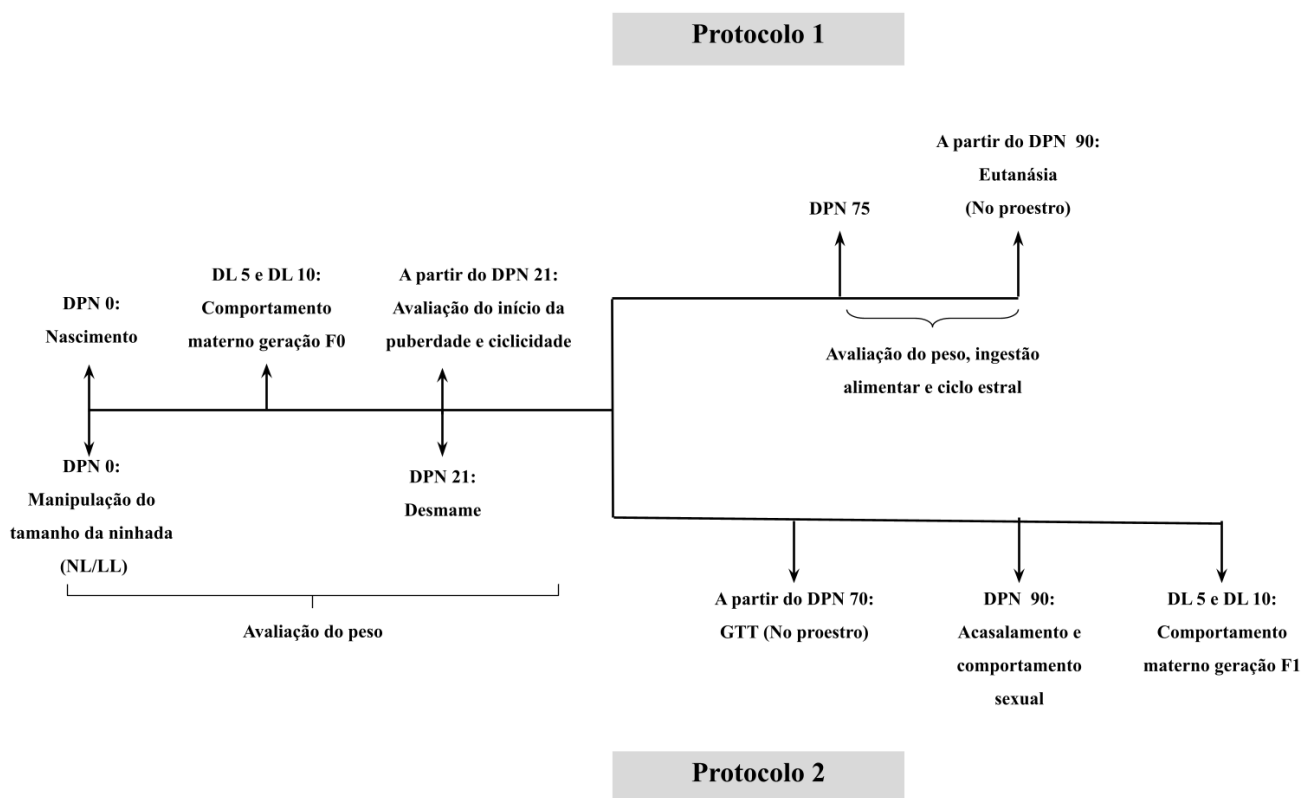


Fig. 2. Desenho experimental dos protocolos 1 e 2. NL: ninhada normal; LL: ninhada expandida; DPN: dia pós-natal; DL: dia lactacional; GTT: teste de tolerância à glicose.

4.4 DETALHAMENTO METODOLÓGICO

4.4.1 Ciclo estral

A fim de se acompanhar o ciclo estral dos animais ao longo do experimento, foram realizados os esfregaços vaginais, sempre no período da manhã, a partir da coleta da secreção

vaginal com o auxílio de uma pipeta plástica com solução salina (NaCl 0,9%). Após a coleta, o lavado vaginal foi colocado em lâmina histológica, sendo observado a fresco em microscópio de luz, com aumento de 10x para análise de proporções e tipos de células (STOPA et al., 2021). As fases do ciclo estral foram determinadas pelos seguintes critérios: proestro – predomínio de células epiteliais nucleadas; estro – predomínio de células epiteliais cornificadas anucleadas; metaestro – presença de células cornificadas e nucleadas, já acompanhadas por um grande número de leucócitos; e, diestro – predomínio de leucócitos (MARCONDES; BIANHI; TANNO, 2002).

Para análise do ciclo estral foram considerados os seguintes parâmetros: normalização do ciclo, sendo este o último dia do 2º ciclo normalizado; coeficiente de proestro, coeficiente de estro, coeficiente de metaestro e diestro, valores obtidos dividindo-se o número de vezes que a fêmea foi diagnosticada em cada fase pela quantidade de dias avaliados, multiplicado por 100; e, duração do ciclo, através da divisão da quantidade de dias avaliados pela quantidade de dias que a fêmea foi diagnosticada em proestro (CHISTYAKOV et al., 2010). A fase do ciclo estral padronizada para realização do teste oral de tolerância a glicose e eutanásia foi o proestro.

4.4.2 Índice de Lee

O índice de Lee foi avaliado e calculado no DPN 21 e 90, considerando-se o peso corporal e o comprimento nasoanal. O cálculo é feito dividindo-se a raiz cúbica do peso corporal em grama pelo comprimento nasoanal em centímetros (BERNARDIS; PATTERSON, 1968).

4.4.3 Teste oral de tolerância à glicose

Após jejum de 6 horas, foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais para determinação da glicemia por meio da fita teste do aparelho Accu-Check Advantage II. Esta primeira dosagem representou a glicemia basal. Imediatamente após, realizou-se a administração via gavagem de glicose 25% na dose de 1,0 g/kg de peso corporal de animal. A partir de então, foram realizadas dosagens de glicose sanguínea pela fita teste nos tempos 15, 30, 60 e 120 minutos após a administração de glicose. Transcorrido os 120 minutos, a ração foi colocada novamente nas caixas dos animais (STOPA et al., 2021).

4.4.4 Avaliação do comportamento sexual

Para análise e comparação do comportamento sexual das fêmeas NL e LL, foram utilizados machos sexualmente experientes provenientes do Biotério Central da Universidade

Estadual de Londrina (UEL). Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro invertido durante 15 dias, período necessário para adaptação. O comportamento sexual foi avaliado durante a fase escura do ciclo invertido claro/escuro, com o auxílio de uma luz vermelha fraca, estando a fêmea receptível (ocorrência de lordose) ao macho, (DOS SANTOS et al., 2016). Todo o processo foi registrado por uma câmera de vídeo. Durante o comportamento, foi observado um total de 10 montas para a obtenção do coeficiente de lordose (LQ, número de lordoses/10 montas X 100) (BEACH, 1976). O grau de lordose foi pontuado em uma escala de 0 a 3 (em que 0 é classificado como ausência de lordose e 3 como lordose máxima) para calcular o escore de lordose (nº total da pontuação de lordose/nº total de respostas de lordose) como descrito em Hardy e Debold (1971). As ratas prenhas foram utilizadas para a análise de fertilidade.

4.4.5 Coleta de sangue e dosagens plasmáticas

Após a decapitação, o sangue foi coletado em tubos heparinizados, sendo centrifugados a 2500 r.p.m. e 4°C, durante 20 minutos. O plasma foi então separado em alíquotas e armazenado a -20 °C para posteriores dosagens de estradiol, colesterol, triglicérides e ácidos graxos livres. Nas dosagens plasmáticas, a espectrofotometria foi utilizada para as determinações das concentrações plasmáticas de triglicérides e colesterol total ("Kits" comerciais, Laborclin, PR), e de ácidos graxos livres (FALHOLT et al., 1973) e ensaio imunoenzimático para determinação de estradiol (EIA 2693; DRG Instruments GmbH).

4.4.6 Análise de fertilidade

As ratas da geração F1 foram submetidas à eutanásia no mesmo dia em que foi realizado o desmame (DPN 21) dos filhotes, geração F2. Após a eutanásia, os cornos uterinos foram utilizados para fazer a determinação do número de implantações uterinas, e, os ovários, para a separação e contagem dos corpos lúteos. A partir da contagem de implantações, corpos lúteos e o número de fetos vivos foram determinados os parâmetros abaixo: taxa de implantação = $(\text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação} / \text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}) \times 100$; taxa de perda pré-implantação = $[(\text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos} - \text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação}) / \text{n}^\circ \text{ de corpos lúteos}] \times 100$; taxa de perda pós-implantação = $[(\text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação} - \text{n}^\circ \text{ de fetos vivos no DL1}) / \text{n}^\circ \text{ de implantações}] \times 100$; taxa de viabilidade fetal = $(\text{n}^\circ \text{ de fetos vivos no DL1} / \text{n}^\circ \text{ de pontos de implantação}) \times 100$ (MONTAGNINI et al., 2018).

4.4.7 Análise histológica dos ovários

Após a eutanásia dos animais, os ovários foram fixados em Bouin aquoso por 48 horas e após esse período, armazenados em álcool 70%. Para a análise histológica utilizou-se o ovário direito, sendo processado para inclusão em parafina e posterior microtomia. Foram feitos 4 cortes de 5 micrômetros em cada ovário. As lâminas histológicas foram coradas em hematoxilina e eosina para visualização em microscopia de luz (DA SILVA FARIA et al., 2008). Para contagem de corpos lúteos foi utilizado aumento de 4 vezes, para folículos antrais, aumento de 10 vezes, e para folículos em crescimento e folículos primários, aumento de 40 vezes.

4.4.8 Análise do comportamento materno

A análise do comportamento materno foi realizada nos DL 5 e 10. Para realização do teste, os filhotes foram removidos da caixa e a mãe permaneceu sozinha por 30 minutos. Após este período, os filhotes foram colocados novamente na caixa e iniciou-se a gravação do comportamento, sendo 1 sessão de 30 minutos por rata. As sessões ocorreram entre às 11h e 14h do ciclo claro/escuro. Os comportamentos observados foram: 1) tempo para recuperação do primeiro filhote; 2) tempo para recuperação de mais da metade dos filhotes; 3) tempo total para recuperação de todos os filhotes; 4) número de vezes que a matriz carregou os filhotes; 4) *full maternal behavior* (número de vezes em que a mãe permanece 3 minutos consecutivos amamentando em cifo); 5) tempo total de estimulação dos tetos; 6) tempo total de limpeza dos filhotes; 7) tempo total de construção de ninho; 8) tempo total amamentando em cifo; 9) tempo total amamentando em qualquer posição; 10) tempo total em que a rata passou sem qualquer tipo de interação com os filhotes - ausência de comportamento materno (MONTAGNINI et al., 2016). O comportamento materno foi avaliado segundo a metodologia, com algumas modificações, proposta por Myers et al. (1989) e Champagne et al. (2003).

4.5 Análise estatística

Inicialmente, uma análise exploratória foi conduzida para avaliar a distribuição normal e homogeneidade das variâncias para cada variável através dos testes de Levene e Shapiro-Wilk, respectivamente. Para os dados que apresentaram distribuição normal e homogeneidade de variância, foram conduzidas análises paramétricas (Teste *t* ou ANOVA de medidas repetidas), sendo representados graficamente por meio da média \pm erro padrão da média. Na ausência de distribuição normal e/ou homogeneidade de variância, as variáveis foram analisadas por testes não paramétricos (teste de Mann-Whitney), representados graficamente

por meio da mediana e 1º e 3º intervalos interquartis. Utilizou-se o teste de Fisher para análise estatística dos graus de lordose referentes à avaliação do comportamento sexual, neste caso os dados foram expressos em porcentagem. Tais análises foram feitas por meio do programa GraphPad Prism 7 e para análise do LQ e escore de lordose, o programa SPSS. Para cada parâmetro analisado foi realizada análise exploratória para exclusão dos *outliers*. Para todos os testes considerou-se nível de significância $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros metabólicos das ratas nulíparas

Com base na análise de medidas repetidas ANOVA, verificou-se que houve interação entre os dias (DPN 0 – 90) e os grupos (NL e LL) no peso corporal ($F_{32.1056} = 9,68$, $p < 0,0001$), com efeito dia ($F_{32.1056} = 4299$, $p < 0,0001$) e grupo ($F_{1.33} = 30,23$, $p < 0,0001$). A expansão do tamanho da ninhada promoveu diminuição do peso corporal a partir do DPN 25 até o DPN 90 ($p < 0,05$) (Fig. 3A).

Apesar do menor peso corporal, as ratas LL apresentaram maior ingestão alimentar em todo o período analisado [$t(21) = 3,54$, $p = 0,0019$] (Fig. 3B). O grupo LL apresentou menor distância nasoanal nos DPN 21 [$t(59) = 3,69$, $p = 0,0005$] e 90 [$t(33) = 2,84$, $p = 0,008$] (Fig. 3C), e menor índice de Lee que o grupo LL no DPN 21 [$t(59) = 2,19$, $p = 0,033$], mas não no DPN 90 [$t(33) = 1,51$, $p = 0,14$] (Fig. 3D). Não houve diferença entre os grupos em relação ao peso das adrenais [$t(28) = 1,45$, $p = 0,16$] e do tecido adiposo perirenal+perigonadal [$t(32) = 1,077$, $p = 0,29$] (Fig. 3E). No entanto, no que se refere ao peso do tecido adiposo retroperitoneal, o grupo LL obteve menor peso do que o grupo NL [$t(31) = 2,61$, $p = 0,014$] (Fig. 3F).

A análise de medidas repetidas evidenciou que houve interação entre o tempo (0 – 120 minutos) e grupo (NL e LL) na glicemia do OGTT ($F_{4.72} = 5,92$, $p = 0,0004$), com efeito tempo ($F_{4.72} = 255,4$, $p < 0,0001$), mas sem efeito grupo ($F_{1.18} = 2,59$, $p = 0,12$) (Fig. 4A). Este resultado foi corroborado pela análise da área sob a curva (AUC) da resposta glicêmica que não apresentou diferença [$t(18) = 0,49$, $p = 0,63$] entre fêmeas LL e NL (Fig. 4B). Apesar de não haver diferença significativa entre os grupos considerando o teste como um todo, o grupo LL apresentou maior glicemia do que as ratas de ninhada normal no tempo 15 minutos do OGTT ($p < 0,001$) (Fig. 4A). Embora o grupo LL tenha apresentado maior pico de glicemia, a análise de medidas repetidas demonstrou retorno glicêmico já no tempo 60 minutos, ou seja, a glicemia após 1 hora de sobrecarga de glicose já não diferia da glicemia basal ($p = 0,73$), o que permaneceu no tempo 120 minutos ($p = 0,051$). No entanto, no grupo NL o retorno glicêmico ocorreu somente após 120 minutos da sobrecarga de glicose ($p = 0,97$) (Fig. 4A). Também não houve diferença entre os grupos nas dosagens plasmáticas de triglicerídeos [$t(32) = 0,76$, $p = 0,45$] (Fig. 4C), colesterol total [$t(33) = 0,57$, $p = 0,57$] (Fig. 4D) e ácidos graxos livres [$t(32) = 0,0046$, $p = 0,99$] (Fig. 4E).

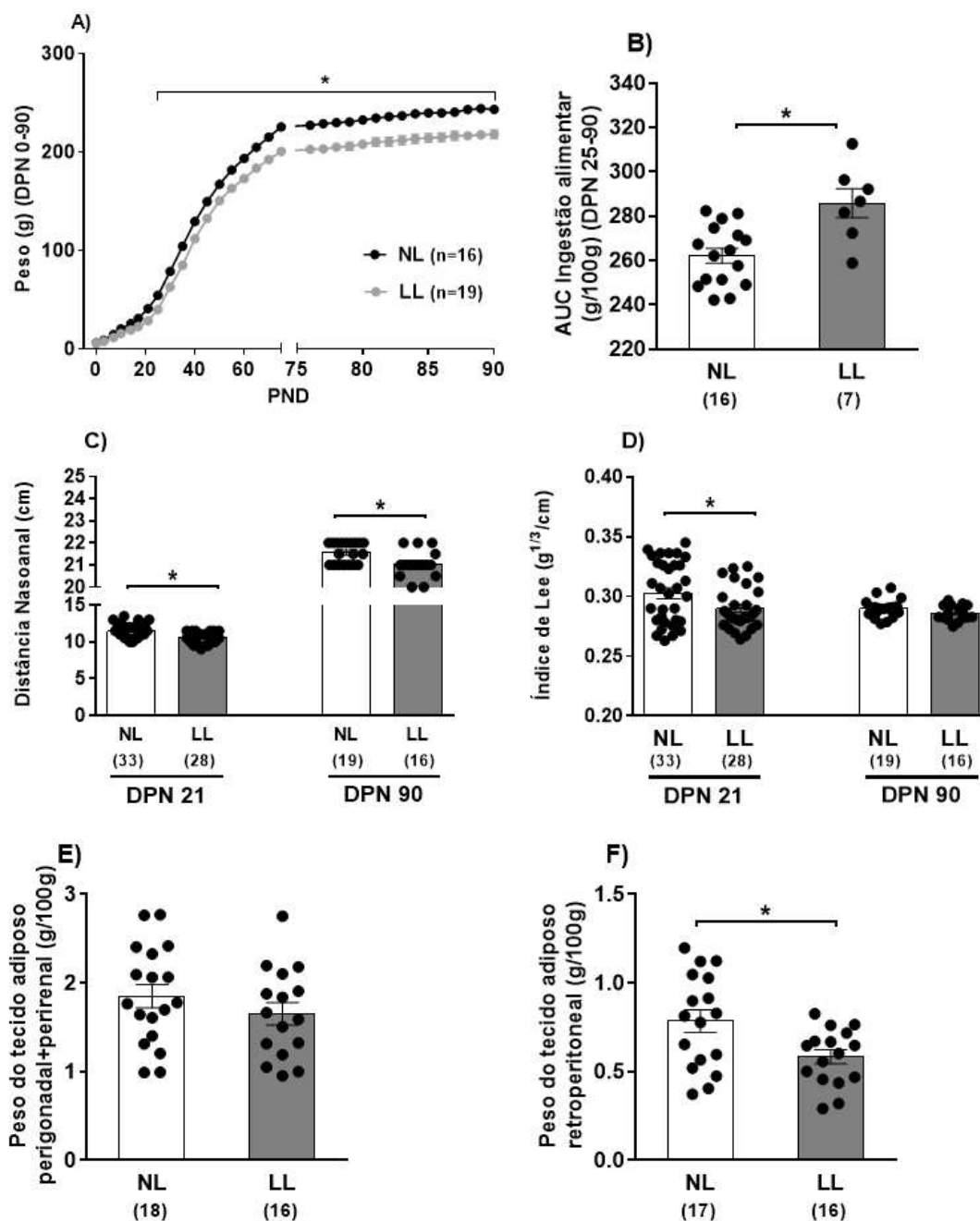


Fig. 3. (A) Curva de peso (g); (B) área sob a curva (AUC) da ingestão alimentar (g/100g de peso) do DPN 25 ao 90; (C) distância nasoanal (cm); (D) índice de Lee ($g^{1/3}/cm$); (E) peso de tecido adiposo perigonadal + perirrenal (g/100 g); (F) tecido adiposo retroperitoneal (g/100 g) de ratas de ninhadas normais (NL) e ninhadas expandidas (LL). O número de animais é mostrado entre parênteses. Os dados são expressos graficamente como média \pm SEM. O teste t de Student foi utilizado para a análise da AUC da ingestão alimentar, distância nasoanal, índice de Lee, pesos do tecido adiposo perigonadal + perirrenal e retroperitoneal e ANOVA de medidas repetidas para a curva de ganho de peso corporal. * $p < 0,05$ NL versus LL.

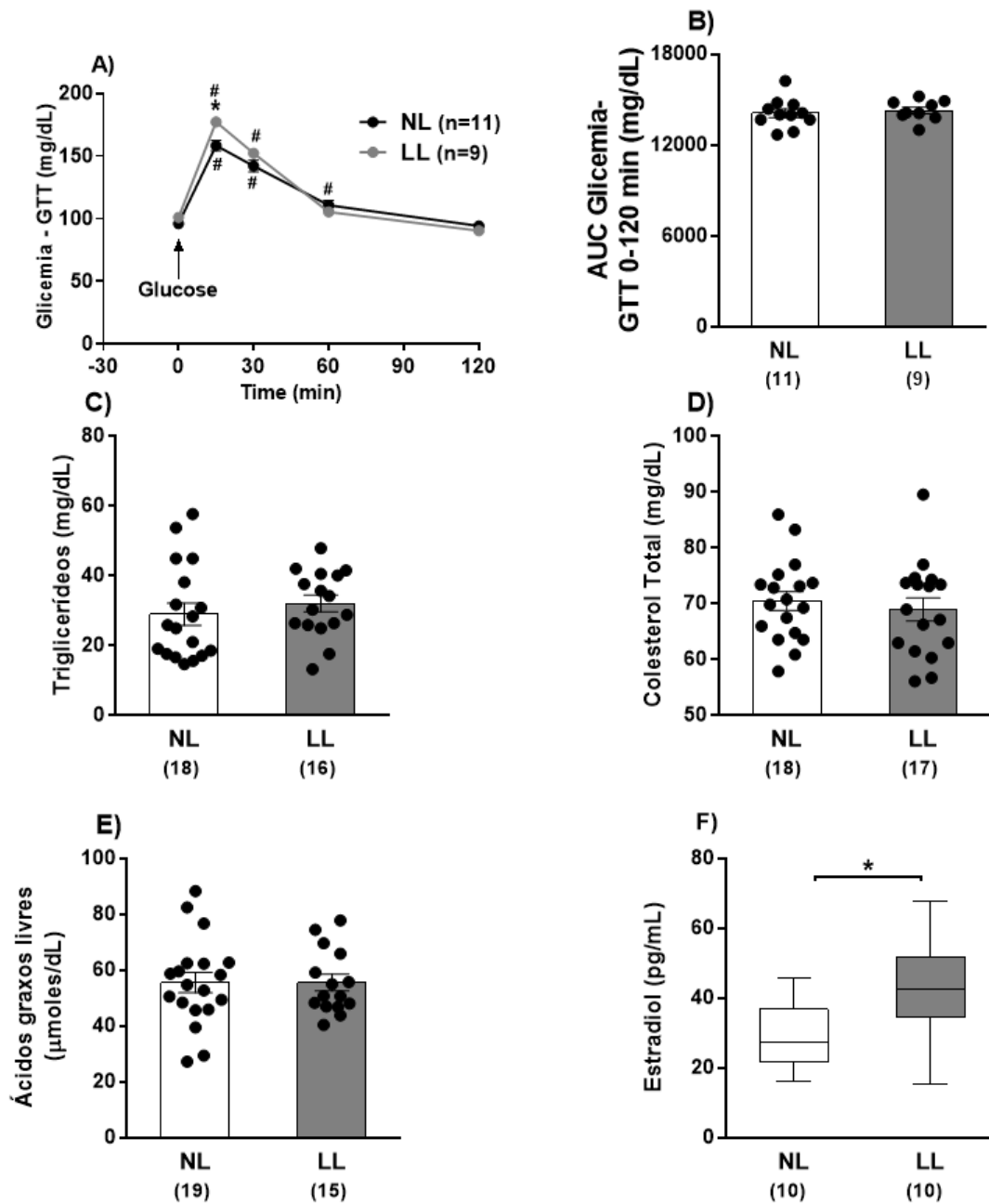


Fig. 4 (A) Glicemia após teste oral de tolerância à glicose (oGTT; mg/dL); (B) área sob a curva (AUC) de OGTT de 0 a 120 min (mg/dL); (C) valores plasmáticos de triglicerídeos (mg/dL); (D) colesterol total (mg/dL); (E) ácidos graxos livres (μmoles/dL); e, (F) estradiol (pg/mL) de ratas de ninhadas normais (NL) e ninhadas expandidas (LL). O número de animais é mostrado entre parênteses. Os dados são expressos graficamente como média ± SEM. O teste t de Student foi usado para a análise de AUC de OGTT, valores de triglicerídeos plasmáticos, colesterol total, ácidos graxos livres e ANOVA de medidas repetidas para glicemia durante OGTT. O teste de Mann-Whitney foi usado para a análise valores de estradiol plasmático. * para $p < 0,05$ NL versus LL e # para $p < 0,05$ entre os pontos do OGTT do mesmo grupo.

5.2 Parâmetros reprodutivos e comportamento sexual das ratas nulíparas

As ratas do grupo LL apresentaram primeiro estro tardio em comparação às ratas NL [t(57)=2,24, p=0,03], diferença não observada no tempo de abertura vaginal [t(59)=1,56, p=0,13] (Tabela 1). Não houve diferença entre os grupos em relação ao período de normalização do ciclo estral [t(59)=1,22, p=0,23], coeficientes de proestro [t(33)=0,56, p=0,58], estro [t(33)=0,09, p=0,93], diestro e metaestro [t(33)=0,41, p=0,68], nem em relação à duração do ciclo estral [t(33)=0,84, p=0,41] (Tabela 1). Também não houve diferença entre os grupos em relação ao peso dos ovários [t(32)=0,68, p=0,5] e útero [t(32)=0,34, p=0,74] (Tabela 1).

Tabela 1. Abertura vaginal (dia pós-natal - DPN), primeiro estro (DPN), início da ciclicidade (DPN), duração do ciclo (dias), coeficiente de proestro (%), coeficiente de estro (%) e coeficientes de metaestro e diestro (%) de ratas de ninhadas normais (NL) e expandidas (LL).

	NL	LL
Abertura vaginal (DPN)	32,39 ± 0,36 (33)	33,32 ± 0,49 (28)
Primeiro estro (DPN)	35,19 ± 0,48 (31)	36,79 ± 0,53 (28)*
Início da ciclicidade (DPN)	50,97 ± 1,01 (33)	52,93 ± 1,27 (28)
Duração do ciclo (dias)	4,98 ± 0,39 (19)	4,54 ± 0,31 (16)
Coeficiente de proestro (%)	22,19 ± 1,54 (19)	23,41 ± 1,48 (16)
Coeficiente de estro (%)	25,18 ± 0,96 (19)	25,03 ± 1,39 (16)
Coeficiente de diestro (%)	52,63 ± 1,95 (19)	51,56 ± 1,62 (16)
Ovários (g/100g de peso)	0,02 ± 0,001 (18)	0,02 ± 0,0009 (16)
Útero (g/100g de peso)	0,26 ± 0,02 (18)	0,27 ± 0,01 (16)

O número de animais é mostrado entre parênteses. Os dados são expressos como média ± SEM e foram analisados pelo teste t de Student. * p < 0,05 NL versus LL.

Os valores plasmáticos de estradiol das ratas subnutridas foram significativamente maiores do que os animais de ninhada normal (U=20, p=0,02) (Fig. 4F), o que foi corroborado pela análise histológica dos ovários, já que o número de folículos antrais foi significativamente maior no grupo LL (U=15, p=0,04) (Fig. 5A, D, E). No entanto, não houve diferença entre os grupos em relação a contagem de folículos primários (U=50, p>0,99) (Fig. 5B) e folículos em crescimento (U=46, p=0,78) (Fig. 5C).

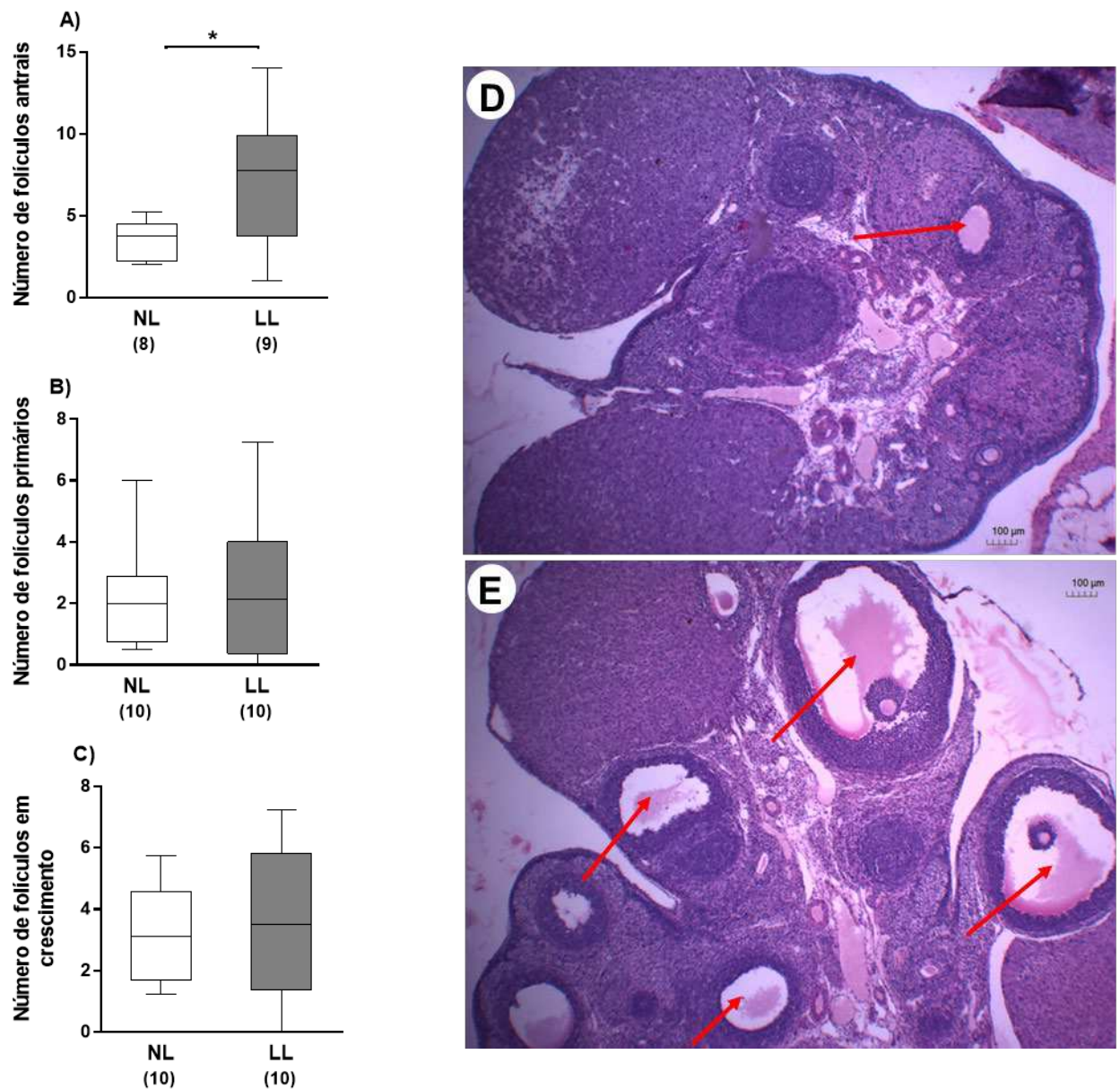


Fig. 5 (A) Número de folículos antrais; (B) número de folículos primários; (C) número de folículos em crescimento de ratas de ninhadas normais (NL) e expandidas (LL). O número de animais é mostrado entre parênteses. Os dados são expressos graficamente como mediana (1º e 3º intervalo interquartil) para o teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$ NL versus LL. Fotomicrografias representativas dos folículos antrais dos ovários de ratas criadas em ninhadas normais (D) e expandidas (E), representadas pelas setas. Coloração: hematoxilina e eosina. Ampliação de 4x.

As ratas subnutridas mostraram-se mais receptíveis aos machos na análise do comportamento sexual, demonstrado pela menor frequência de lordoses de magnitude 0 ($p=0,0007$) e maior frequência de lordoses de magnitude 3, em comparação com as ratas do grupo controle ($p=0,02$). Não houve diferença, no entanto, em relação ao coeficiente de lordose ($U=58$, $P=0,17$) e escore de lordose ($U=77,5$, $p=0,74$) (Tabela 2).

Tabela 2. Coeficiente de lordose (LQ= nº de posturas de lordose/montagens totais x 100), escore de lordose (nº total da pontuação de lordose/nº total de respostas de lordose) e magnitude de lordose (classificada em uma escala de 0 a 3, onde 0 é a ausência de lordose e 3 é a lordose máxima) de ratas de ninhadas normais (NL) e expandidas (LL).

Parâmetros	NL (14)	LL (12)
LQ (%)	80 [50-92.50]	85 [80-100]
Escore	2.21 [1.24-4.07]	2.63 [1.85-2.94]
Magnitude 0	29% {41/140}	12% {14/120}*
Magnitude 1	23% {32/140}	20% {24/120}
Magnitude 2	31% {43/140}	38% {46/120}
Magnitude 3	17% {24/140}	30% {36/120}*

Para LQ e escore, os dados são apresentados como mediana [1º - 3º intervalos interquartis], analisados pelo teste de Mann-Whitney. Os dados de magnitude de lordose são apresentados em porcentagem, com valores entre chaves mostrando o número de observações em cada grupo de magnitude da lordose/número do total de observações, analisados pelo teste exato de Fisher. Os números entre as chaves representam o número de animais por grupo. * $p<0,05$ em comparação com o grupo NL.

5.3 Comportamento materno geração F0

Os parâmetros de comportamento materno da geração F0 foram analisados pelo teste de medidas repetidas ANOVA. A média \pm erro padrão para cada parâmetro é apresentada na tabela 3 e a interação entre o tempo e grupo e o efeito do tempo e grupo é apresentada na tabela 4. Com base nas análises realizadas verificou-se um retardo na recuperação do primeiro filhote e na recuperação de mais da metade dos filhotes pelas matrizes de ninhada expandida no DL 5 e DL 10, sendo que o tempo para recuperação de mais da metade dos filhotes foi maior no DL 5 do que no DL 10 em ambos os grupos (Tabela 3).

Em relação a latência para recuperação de todos os filhotes, observou-se maior latência nas matrizes de ninhada expandida ($F_{1,14}=6,38$, $p=0,02$) no DL 5 e DL 10, sendo que ambos os grupos levaram mais tempo para recuperar todos os filhotes no DL 5 do que no DL 10. Não houve diferença entre os grupos em relação número de vezes em que a mãe carregou os filhotes

(seja para o ninho ou não) tanto no DL 5 como no DL 10, no entanto, ambos os grupos carregaram mais vezes os filhotes no DL 10 do que no DL 5.

Não houve diferença entre os grupos em relação parâmetro denominado *Full Maternal Behavior*, que indica a quantidade de vezes em que a matriz permaneceu pelo menos três minutos consecutivos amamentando mais da metade na ninhada em posição cifótica, tanto no DL 5 como no DL10.

Também não houve diferença entre os grupos no tempo total destinado à estimulação dos tetos, tempo total destinado à limpeza dos filhotes, tempo total destinado à construção do ninho, nem no tempo total amamentando mais da metade da ninhada em cifose ou tempo total amamentando em qualquer outra posição, tanto no DL 5 como no DL 10. Além disso, o tempo em que as matrizes não apresentavam comportamento materno também não diferiu entre os grupos, tanto no DL 5 como no DL 10.

Parâmetros	DL 5		DL 10	
	NL (9)	LL (7)	NL (9)	LL (7)
Tempo para recuperação do primeiro filhote (s)	20,11 ± 3,39	46,71 ± 19,41*	20,56 ± 2,35	53,43 ± 12,39*
Tempo para recuperação de mais da metade dos filhotes (s)	99,78 ± 14,34 [#]	170,3 ± 32,2* [#]	87,33 ± 12,58	131,7 ± 22,94*
Tempo total para recuperação de todos os filhotes (s)	168,6 ± 20,4 [#]	327,4 ± 74,47* [#]	133,4 ± 16,07	212,4 ± 31,74*
Número de vezes que a matriz carregou os filhotes (s)	21,78 ± 3,47	32,71 ± 4,16	30,78 ± 8,94 [#]	52,29 ± 7,72 [#]
<i>Full maternal behavior</i>	1,33 ± 0,55	1,857 ± 0,4	2,22 ± 0,52	1,43 ± 0,48
Tempo total de estimulação dos tetos (s)	26,87 ± 7,09	24,57 ± 6,5	14,11 ± 5,36	11,86 ± 3,65
Tempo total de limpeza dos filhotes (s)	140,8 ± 32,98	142 ± 35,41	130,3 ± 35,42	136,7 ± 39,89
Tempo total de construção de ninho (s)	26,56 ± 7,29	29,29 ± 8,34	20 ± 5,83	24,43 ± 9,24
Tempo total amamentando mais da metade da ninhada em cifose (s)	366,7 ± 11	544 ± 65,33	560,7 ± 101,2	443,1 ± 111,7
Tempo total amamentando em qualquer posição (s)	379,1 ± 105,7	556,7 ± 64,54	584,8 ± 100,5	459,4 ± 109,5
Tempo total em que a rata passou sem qualquer tipo de interação com os filhotes (s)	1227 ± 101,7	1047 ± 82,28	1051 ± 106,3	1248 ± 141,7

Tabela 3. Parâmetros do comportamento materno da geração F0.

O número de animais é mostrado entre parênteses. O grupo NL representa as matrizes com ninhada normal e o grupo LL, as matrizes com ninhada expandida. s: tempo em segundos. Os dados são expressos como média ± erro padrão. * indica $p < 0,05$ entre as matrizes do grupo NL e LL e [#] para $p < 0,05$ dentro do mesmo grupo em dias diferentes.

Tabela 4. Interação entre o tempo e grupo, o efeito do tempo e grupo da análise de medidas repetidas ANOVA do comportamento materno da geração F0.

Parâmetros de comportamento materno	Interação entre tempo e grupo		Efeito tempo		Efeito grupo	
		<i>Valor de p</i>		<i>Valor de p</i>		<i>Valor de p</i>
Tempo para recuperação do primeiro filhote	F (1, 14) = 0,21	0,65	F (1, 14) = 0,28	0,61	F (1, 14) = 5,32	0,04
Tempo para recuperação de mais da metade dos filhotes	F (1, 14) = 1,28	0,28	F (1, 14) = 4,89	0,04	F (1, 14) = 4,71	0,05
Tempo total para recuperação de todos os filhotes	F (1, 14) = 2,21	0,16	F (1, 14) = 7,81	0,01	F (1, 14) = 6,38	0,02
Número de vezes que a matriz carregou os filhotes	F (1, 14) = 0,87	0,37	F (1, 14) = 6,37	0,024	F (1, 14) = 4,59	0,05
<i>Full maternal behavior</i>	F (1, 14) = 1,97	0,18	F (1, 14) = 0,24	0,63	F (1, 14) = 0,06	0,81
Tempo total de estimulação dos tetos	F (1, 14) = 0,0002	0,99	F (1, 14) = 4,51	0,05	F (1, 14) = 0,13	0,73
Tempo total de limpeza dos filhotes	F (1, 14) = 0,03	0,88	F (1, 14) = 0,24	0,63	F (1, 14) = 0,006	0,92
Tempo total de construção de ninho	F (1, 14) = 0,0096	0,92	F (1, 14) = 0,44	0,52	F (1, 14) = 0,31	0,59
Tempo total amamentando mais da metade da ninhada em cifose	F (1, 14) = 2,81	0,12	F (1, 14) = 0,28	0,61	F (1, 14) = 0,07	0,79
Tempo total amamentando em qualquer posição	F (1, 14) = 4,13	0,06	F (1, 14) = 0,15	0,71	F (1, 14) = 0,05	0,82
Tempo total sem qualquer tipo de interação com os filhotes	F (1, 14) = 6,66	0,02	F (1, 14) = 0,03	0,87	F (1, 14) = 0,004	0,95

5.4 Comportamento materno geração F1

Os parâmetros de comportamento materno foram analisados pelo teste de medidas repetidas ANOVA. A média \pm erro padrão para cada parâmetro é apresentada na tabela 5 e a interação entre o tempo e grupo e o efeito do tempo e grupo é apresentada na tabela 6. Com base nas análises realizadas verificou-se que não houve diferença na latência para recuperação do primeiro filhote, nem na latência para recuperação de mais da metade dos filhotes tanto no DL 5 como no DL 10, no entanto, ambos os grupos obtiveram maior latência para recuperação de mais da metade dos filhotes no DL 5 do que no DL 10.

Não houve diferença entre os grupos em relação à latência para recuperação de todos os filhotes nos dois dias analisados, porém, os dois grupos levaram mais tempo para recuperar todos os filhotes no DL 5 do que no DL 10. Também não houve diferença entre os grupos em relação ao número de vezes que as matrizes carregaram seus filhotes, nem em relação ao número de vezes que as matrizes apresentaram *Full Maternal Behavior*, no DL 5 e DL 10, no entanto, ambos os grupos apresentaram maior número de vezes de *Full Maternal Behavior* no DL 10 do que no DL 5.

As fêmeas LL não diferiram das NL, nos dois dias analisados, em relação ao tempo total destinado à estimulação dos tetos, tempo total destinado à limpeza dos filhotes, tempo total destinado à construção do ninho, nem no tempo total destinado à amamentação na posição cifótica, embora, ambos os grupos tenham permanecido maior tempo amamentando em cifose no DL 10 do que no DL 5.

Também não houve diferença entre os grupos em relação ao tempo total amamentando em qualquer posição, e, em relação ao tempo em que as matrizes não apresentavam comportamento materno, tanto no DL 5 como no DL 10.

Tabela 5. Parâmetros do comportamento materno da geração F1.

Parâmetros	DL 5		DL 10	
	NL	LL	NL	LL
Tempo para recuperação do primeiro filhote (s)	123,3 ± 50,65 (10)	99,22 ± 43,36 (9)	63,2 ± 24,95 (10)	26,56 ± 5,99 (9)
Tempo para recuperação de mais da metade dos filhotes (s)	574,8 ± 189,3 (9)	192,3 ± 66,77 (9)	98,44 ± 15,46 [#] (9)	63,33 ± 9,15 [#] (9)
Tempo total para recuperação de todos os filhotes (s)	285,3 ± 95,86 (6)	313,8 ± 80,99 (9)	180,2 ± 44,71 [#] (6)	117,7 ± 18,03 [#] (9)
Número de vezes que a matriz carregou os filhotes (s)	9,2 ± 1,53 (10)	9,111 ± 1,09 (9)	16,6 ± 5,21 (10)	11,67 ± 1,86 (9)
<i>Full maternal behavior</i>	0,7 ± 0,42 (10)	1,111 ± 0,45 (9)	1,8 ± 0,42 [#] (10)	1,667 ± 0,5 [#] (9)
Tempo total de estimulação dos tetos (s)	9,7 ± 2,51 (10)	21,33 ± 6,14 (9)	23,8 ± 6,29 (10)	16,22 ± 3,55 (9)
Tempo total de limpeza dos filhotes (s)	125 ± 22,25 (10)	104,1 ± 15,64 (8)	213,2 ± 43,07 (10)	150,8 ± 41,19 (9)
Tempo total de construção de ninho (s)	5,1 ± 1,99 (10)	6,333 ± 1,68 (9)	7,2 ± 4,69 (10)	2,778 ± 1,97 (9)
Tempo total amamentando mais da metade da ninhada em cifo (s)	248,8 ± 106,2 (10)	352,1 ± 92,4 (9)	470,9 ± 84,86 [#] (10)	472,6 ± 81,69 [#] (9)
Tempo total amamentando em qualquer posição (s)	436,2 ± 97,17 (10)	462,6 ± 87,32 (9)	514,7 ± 79,09 (10)	498,8 ± 72,4 (9)
Tempo total em que a rata passou sem qualquer tipo de interação com os filhotes (s)	1224 ± 113,9 (10)	1161 ± 94,19 (9)	1041 ± 96,67 (10)	1131 ± 102,4 (9)

O número de animais é mostrado entre parênteses. O número de animais é mostrado entre parênteses. O grupo NL representa as fêmeas de ninhada normal e o grupo LL, as fêmeas de ninhada expandida. S: tempo total em segundos. Os dados são expressos como média ± erro padrão. [#] para p<0,05 dentro do mesmo em dias diferentes.

Tabela 6. Interação entre o tempo e grupo, o efeito do tempo e grupo da análise de medidas repetidas ANOVA do comportamento materno da geração F1.

Parâmetros de comportamento materno	Interação entre tempo e grupo		Efeito tempo		Efeito grupo	
		<i>Valor de p</i>		<i>Valor de p</i>		<i>Valor de p</i>
Tempo para recuperação do primeiro filhote	F (1, 17) = 0,03	<i>0,87</i>	F (1, 17) = 3,08	<i>0,09</i>	F (1, 17) = 0,77	<i>0,39</i>
Tempo para recuperação de mais da metade dos filhotes	F (1, 16) = 2,9	<i>0,11</i>	F (1, 16) = 8,8	<i>0,01</i>	F (1, 16) = 4,40	<i>0,05</i>
Tempo total para recuperação de todos os filhotes	F (1, 13) = 0,57	<i>0,46</i>	F (1, 13) = 6,28	<i>0,03</i>	F (1, 13) = 0,06	<i>0,82</i>
Número de vezes que a matriz carregou os filhotes	F (1, 17) = 0,68	<i>0,42</i>	F (1, 17) = 2,86	<i>0,11</i>	F (1, 17) = 0,64	<i>0,43</i>
<i>Full maternal behavior</i>	F (1, 17) = 0,51	<i>0,49</i>	F (1, 17) = 4,68	<i>0,05</i>	F (1, 17) = 0,08	<i>0,79</i>
Tempo total de estimulação dos tetos	F (1, 17) = 4,03	<i>0,06</i>	F (1, 17) = 0,88	<i>0,36</i>	F (1, 17) = 0,16	<i>0,69</i>
Tempo total de limpeza dos filhotes	F (1, 17) = 2,02	<i>0,17</i>	F (1, 17) = 2,22	<i>0,16</i>	F (1, 17) = 0,18	<i>0,68</i>
Tempo total de construção de ninho	F (1, 17) = 0,76	<i>0,4</i>	F (1, 17) = 0,05	<i>0,83</i>	F (1, 17) = 0,37	<i>0,55</i>
Tempo total amamentando mais da metade da ninhada em cifose	F (1, 17) = 0,44	<i>0,52</i>	F (1, 17) = 5,01	<i>0,04</i>	F (1, 17) = 0,24	<i>0,63</i>
Tempo total amamentando em qualquer posição	F (1, 17) = 0,07	<i>0,79</i>	F (1, 17) = 0,52	<i>0,48</i>	F (1, 17) = 0,003	<i>0,95</i>
Tempo total sem qualquer tipo de interação com os filhotes	F (1, 17) = 0,74	<i>0,40</i>	F (1, 17) = 1,42	<i>0,25</i>	F (1, 17) = 0,01	<i>0,91</i>

5.5 Análise de fertilidade

Não houve diferença entre os grupos em relação ao número de corpos lúteos [t(18)=0,55, p=0,59], taxa de implantação [t(15)=1,63, p=0,12], taxa de perda pré-implantação [t(15)=1,63, p=0,12], taxa de perda pós-implantação (U=39, p=0,97), número de fetos vivos (U=49, p=0,95), e taxa de viabilidade fetal (U=35, p=0,97) (Tabela 7).

Tabela 7. Número de corpos lúteos, número de fetos vivos, taxa de implantação (%), taxa de perda pré-implantação (%), taxa de perda pós-implantação (%) e taxa de viabilidade fetal (%) de ratas normais (NL) e ninhadas grandes (LL). O número de animais é mostrado entre parênteses.

	NL	LL
Número de corpos lúteos	16,30 ± 0,79 (10)	15,60 ± 0,99 (10)
Número de fetos vivos	13 [12,75-14] (10)	13,00 [12-14] (10)
Taxa de implantação (%)	79,61 ± 1,73 (8)	86,33 ± 3,56 (9)
Taxa de perda pré-implantação (%)	20,39 ± 1,73 (8)	13,67 ± 3,56 (9)
Taxa de perda pós-implantação (%)	3,33 [0-7,02] (8)	2,94 [0-7,143] (10)
Taxa de viabilidade fetal (%)	96,67 [92,98-100] (8)	94,12 [92,86-100] (9)

Os dados são expressos como média ± SEM para o teste t de Student (número de corpos lúteos, taxa de implantação e taxa de perda pré-implantação) e mediana (1° e 3° intervalo interquartil) para o teste de Mann-Whitney (número de fetos vivos, taxa de perda pós-implantação e taxa de viabilidade fetal).

6. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a subnutrição pós-natal induzida pelo método de expansão do tamanho da ninhada resultou em menor peso desde a infância até a idade adulta, redução da adiposidade e do crescimento longitudinal, apesar do aumento da ingestão alimentar em ratas adultas. Curiosamente, esses efeitos foram acompanhados pelo aumento do número de folículos antrais nos ovários, dos valores plasmáticos de estradiol e da receptividade sexual desses animais.

De fato, menor peso corporal e comprimento em ratas de ninhadas expandidas no desmame e na idade adulta estão de acordo com dados anteriores (REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008). Apesar da redução do peso corporal e da adiposidade das ratas LL, esses animais apresentaram aumento na ingestão alimentar, conforme demonstrado por Marangon et al. (2020), em que os ratos LL eram hiperfágicos. Semelhantemente, a restrição calórica/proteica materna durante o período de lactação promove hiperfagia em machos e fêmeas, embora esses animais permaneçam com peso corporal inferior ao grupo controle (ZAMBRANO et al., 2006; JIMENEZ-CHILLARON et al., 2006).

Anteriormente, já foi demonstrado que a redução da adiposidade induzida pela subnutrição neonatal está associada a concentrações plasmáticas mais baixas de leptina e insulina (LÓPEZ- SOLDADO; MUNILLA e HERRERA, 2006), o que pode estar relacionado com a estimulação do sistema NPY hipotalâmico, demonstrado por um número aumentado de neurônios NPY no ARC e densidade aumentada de fibras NPY no PVN (ENGELBREGT et al., 2001; PLAGEMANN, 2006; REMMERS; FODOR; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2008). Visto que o NPY atua no eixo orexígeno (SCHUWARTZ et al., 2000), o aumento da liberação de NPY, como observado em animais LL, poderia explicar a maior ingestão alimentar nas ratas de ninhada expandida no presente estudo.

Apesar de apresentarem maior ingestão alimentar desde a infância até a idade adulta, as ratas LL permaneceram com peso inferior ao grupo NL, evidenciando uma disfunção no metabolismo energético. Animais subnutridos por restrição calórica/proteica materna durante a lactação possuem um perfil semelhante decorrente de alterações no eixo hipotálamo-hipófise-tireoide, que resultam em elevação dos valores plasmáticos dos hormônios tireoidianos (PASSOS et al., 2002)

Embora os animais do grupo LL não tenham apresentado *catch-up* durante o período avaliado, López-Soldado et al. (2006) observaram *catch-up* em fêmeas LL aos 20 meses de idade. O perfil lipídico desses animais LL aos 20 meses apresentou valores mais elevados de colesterol total, com aumento da fração HDL e LDL, sem diferença nos valores de

triglicerídeos, diferentemente do presente estudo, onde não foi observada diferença no perfil lipídico do grupo NL e LL. Assim, o *catch-up* e suas alterações metabólicas associadas, possivelmente, levariam mais tempo para ocorrer em fêmeas LL.

A expansão do tamanho da ninhada resultou em maior pico de glicose aos 15 minutos do OGTT no grupo LL, sem diferenças na glicemia nos demais pontos, o que pode indicar um sinal precoce e discreto de intolerância à glicose nesses animais. Waterland e Garza (2002) observaram menor resposta insulínica ao estímulo de glicose em machos LL, portanto, o fato do grupo LL ter apresentado pico de glicose mais elevado pode ser devido aos menores valores de insulina circulante. Por outro lado, outro estudo demonstrou que, em fêmeas LL, a glicemia após sobrecarga de glicose não difere do grupo controle, apesar desses animais possuírem menores valores plasmáticos de insulina, sugerindo um aumento da sensibilidade à ação deste hormônio (LÓPEZ-SOLDADO; MUNILLA; HERRERA, 2006), o que contribui para o retorno dos valores de glicose aos valores de pré-carga (NATHAN et al., 2007).

No presente estudo, as ratas da ninhada expandida apresentaram atraso no início da puberdade, observado pela ocorrência tardia do primeiro estro, sem diferença na abertura vaginal. De acordo a literatura, o atraso no início da puberdade em animais submetidos à subnutrição no início do desenvolvimento é esperado. O estudo de Caron et al. (2012), realizado com camundongos fêmeas de ninhada expandida, observou atraso na abertura vaginal e primeiro estro, o que foi atribuído à menor densidade de fibras kisspeptina no núcleo pré-óptico mediano em comparação com animais alimentados normalmente. No entanto, Smith e Spencer (2012) demonstraram que ratas subnutridas devido à expansão do tamanho da ninhada não diferiram de ninhadas normais na abertura vaginal, que foi usada como marco para o início da puberdade, e nos valores de estradiol no dia da abertura vaginal, sem diferença na quantidade de neurônios kisspeptina no núcleo ântero-ventral periventricular.

Ratas LL apresentam uma redução persistente no peso corporal e atraso no início da puberdade, alterações que foram acompanhadas por uma diminuição nos valores de leptina e RNA mensageiro (mRNA) de Kiss1 no hipotálamo, indicando que os déficits de energia nos estágios iniciais do desenvolvimento têm um impacto inibitório duradouro na expressão do mRNA de Kiss1 no hipotálamo (CASTELLANO et al., 2011). Curiosamente, neste mesmo estudo, as ratas subnutridas na puberdade também apresentaram respostas gonadotrópicas aumentadas ao estímulo externo de kisspeptina.

A abertura vaginal e a ciclicidade estral são consideradas marcos do início da puberdade em ratas. O período de abertura vaginal coincide com a primeira ovulação seguida do primeiro estro; entretanto, esses eventos podem ser dissociados se houver alteração nas concentrações

de estradiol circulante, que podem ser suficientes para estimular a maturação do epitélio vaginal, mas não suficientes para promover picos de LH e FSH necessários para a ovulação (RIVEST, 1991). Assim, é possível que a subnutrição durante a lactação pode ser responsável por alterações nas concentrações ou ações do estradiol em ratas púberes, que apresentaram atraso na primeira ovulação e não na abertura vaginal. No entanto, esse prejuízo na ciclicidade estral em ratas LL parece desaparecer ao longo do desenvolvimento sexual, uma vez que não foram observadas alterações no início da ciclicidade, duração dos ciclos estrais ou coeficientes das fases do ciclo estral em comparação com as NL.

Curiosamente, na idade adulta, o grupo LL apresentou valores plasmáticos mais elevados de estradiol na tarde do proestro, acompanhados de aumento do número de folículos antrais, conforme revelado pela análise histológica dos ovários, sugerindo que a ação das gonadotrofinas LH e FSH também pode estar aumentada nesses animais. De modo semelhante, Da Silva Faria et al. (2008) demonstraram que a subnutrição materna durante a lactação foi responsável por mudanças nos parâmetros reprodutivos da prole durante a puberdade, como aumento do número de folículos pré-antrais e pequenos folículos antrais, associado a aumento da expressão de receptores de FSH e LH nos ovários e aumento dos valores circulantes de FSH, responsável pela foliculogênese.

Paralelamente ao aumento dos valores de estradiol circulante, as ratas LL também apresentaram maior receptividade ao macho, observada pela maior intensidade de lordose. O comportamento sexual de ratas está intimamente relacionado com a produção/ação dos hormônios ovarianos estradiol e progesterona. Ratas ovariectomizadas apresentam comportamento sexual positivo ao administrar apenas estradiol, e a intensidade da resposta é dependente da dose (POWERS, 1970). Dessa forma, sugerimos que a maior receptividade sexual das fêmeas LL, seja devido à elevação dos valores plasmáticos de estradiol nesses animais.

Até o momento, não existem estudos que tenham avaliado o efeito da subnutrição pós-natal induzida pela expansão do tamanho da ninhada no comportamento sexual de ratas adultas. No entanto, Matsuzaki et al. (2018) observaram que a subnutrição pré-natal induzida pela restrição alimentar materna resultou em menor coeficiente de lordose e taxa de lordose na prole (ratas ovariectomizadas com idade aproximada de 80 dias) e que esses resultados estariam relacionados à menor expressão de receptores de progesterona no hipotálamo. Esses dados sugerem que dependendo do período do desenvolvimento e a severidade da subnutrição, os efeitos sobre o sistema reprodutor feminino podem divergir. Além disso, nosso estudo também

é pioneiro em demonstrar que a expansão do tamanho da ninhada não altera parâmetros de fertilidade.

O presente estudo verificou que matrizes de ninhadas expandidas apresentam um retardo na recuperação do primeiro filhote em comparação com as matrizes de ninhadas normais, no entanto, existe uma lacuna na literatura em relação ao efeito da expansão do tamanho da ninhada em relação aos fatores que poderiam explicar tal resultado. Sabe-se que o *retrieval behavior* está diretamente relacionado à motivação materna (BAYERL et al., 2016), e dessa forma, é possível que as matrizes de ninhada expandida apresentem menor motivação, possivelmente, devido ao estresse decorrente da expansão da ninhada e aumento da demanda energética. As matrizes de ninhada expandida também levaram mais tempo para a recuperação de mais da metade dos filhotes e para a recuperação de todos os filhotes, o que é esperado já que o tamanho da ninhada é maior. Curiosamente, tanto matrizes de ninhadas expandidas como matrizes de ninhadas normais levaram mais tempo para recuperação de mais da metade dos filhotes e todos os filhotes no DL 5 do que no DL 10.

Embora as matrizes de ninhadas expandidas levem mais tempo para recuperar o primeiro filhote, elas não apresentam diferenças com o grupo controle em relação aos demais parâmetros do comportamento materno, ou seja, não existe prejuízo no tempo destinado ao cuidado e amamentação dos filhotes, o que está de acordo com o estudo de Champagne et al. (2003), que demonstrou não haver diferenças nos comportamentos de limpeza e cuidado dos filhotes e amamentação na posição cifótica entre ninhadas de tamanhos diferentes (5 a 18 filhotes).

Segundo Champagne et al. (2003), o comportamento materno da matriz é transmitido para a prole feminina. No entanto, embora o presente estudo tenha demonstrado que as matrizes de ninhada expandida levaram mais tempo para recuperação do primeiro filhote, a prole dessas fêmeas (geração F1, grupo LL) não apresentou diferenças, em comparação com o grupo controle, na latência de recuperação do primeiro filhote, mais da metade ou todos os filhotes.

A análise do comportamento materno da geração F1 revelou que não houve diferenças entre o grupo LL e o grupo controle em relação ao cuidado e limpeza dos filhos, nem em relação a amamentação ou posição cifótica. Dessa forma, nosso estudo também é pioneiro em demonstrar que a subnutrição moderada no período da lactação não resulta em prejuízos na responsividade materna. Felix et al. (2014) demonstraram que fêmeas subnutridas durante o período gestacional e lactacional apresentam retardo na recuperação do primeiro filhote e de metade na ninhada, além de destinarem menos tempo na construção do ninho. Enquanto que Salcedo et al. (2018) demonstrou prejuízos na posição cifótica de amamentação de fêmeas

subnutridas. Os autores afirmam que a subnutrição no período perinatal altera o desenvolvimento e funcionalidade do sistema nervoso central, resultando em deficiências cognitivas atencionais que prejudicam a responsividade materna.

Sabe-se que a neurogênese no circuito materno cortical e subcortical e a conectividade aferente ocorrem, principalmente, durante a terceira semana de gestação (SALAS et al., 2019). Portanto, é possível sugerir que o período intrauterino é crucial para o desenvolvimento das estruturas relacionadas à expressão do comportamento materno, sendo que complicações nutricionais nesse período resultam, em longo prazo, em prejuízos na resposta materna aos filhotes, enquanto que a nutrição insuficiente apenas no período lactacional não repercute negativamente no comportamento materno desses animais.

É importante ressaltar que os dados do presente estudo que diferem de outros estudos podem ser atribuídos a diferentes espécies de animais e modelos de subnutrição utilizados, uma vez que a duração e a gravidade da subnutrição podem ser responsáveis por diferentes graus e tipos de alterações metabólicas e reprodutivas.

Assim, apesar do presente estudo demonstrar que a subnutrição durante o período lactacional induzida pela expansão do tamanho da ninhada promove aumento do número de folículos antrais, estradiol circulante e melhor performance no comportamento sexual, não significa, necessariamente, que a subnutrição induzida pela expansão do tamanho da ninhada resulta em benefícios no perfil reprodutivo desses animais, uma vez que o aumento dos valores de estradiol, principalmente a exposição prolongada, pode promover repercussões indesejadas, como potencializar o surgimento de tumores em órgãos-alvo do estradiol, como mama e útero (SILVA et al., 2004; ALBERNAZ, 2013).

7. CONCLUSÃO

De acordo com os dados encontrados, a subnutrição pós-natal resulta em repercussões no metabolismo, programando os animais a permanecerem com menor peso ainda que possuam maior ingestão alimentar. Além disso, o nosso modelo de subnutrição pós-natal resultou em alteração do perfil reprodutivo devido à elevação dos valores plasmáticos de estradiol, que, embora inicialmente possa parecer uma vantagem, devido à melhor performance no comportamento sexual demonstrado pelo grupo subnutrido, em longo prazo, pode repercutir negativamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, M. M. **Fisiologia**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ALBERNAZ, M. A. et al. Consenso sobre terapia hormonal e câncer de mama. **Femina**, v. 41, n. 2, p. 56, 2013.

ANSELMO-FRANCI, SZAWKA, R. S. Controle Neuroendócrino da Reprodução Feminina. Em: Antunes-Rodrigues J; Cols. (Org.). Neuroendocrinologia Básica e Aplicada. Rio de Janeiro. 2005.p. 319-340.

BARROS, R. P. A. et al. Muscle GLUT4 regulation by estrogen receptors ER β and ER α . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 5, p. 1605-1608, 2006.

BAYERL, D. S. et al. Antagonism of V1b receptors promotes maternal motivation to retrieve pups in the MPOA and impairs pup-directed behavior during maternal defense in the mpBNST of lactating rats. **Hormones and behavior**, v. 79, p. 18-27, 2016.

BEACH, F. A. Prolonged hormone deprivation and pretest cage adaptation as factors affecting the display of lordosis by female rats. **Physiology & Behavior**, v. 16, n. 6, p. 807-808, 1976.

BERNAL, A. B. et al. Maternal undernutrition significantly impacts ovarian follicle number and increases ovarian oxidative stress in adult rat offspring. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15558, 2010.

BERNARDIS, L. L.; PATTERSON, B. D. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of endocrinology**, v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968.

CARON, E. 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, J. M. 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.

CHAMPAGNE, F. A. et al. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects of environment on development. **Physiology & Behavior**, v. 79, n. 3, p. 359-71, 2003.

CHAN, K. A. et al. Early life exposure to undernutrition induces ER stress, apoptosis, and reduced vascularization in ovaries of adult rat offspring. **Biology of Reproduction**, v. 92, n. 4, p. 110, 1-14, 2015.

CHERNOFF, N. et al. Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. **Reproductive Toxicology**, v. 28, n. 4, p. 489-494, 2009.

CHISTYAKOV, V. A. et al. Effect of Plastoquinone Derivative 10-(6'-Plastoquinonyl) decyltriphenylphosphonium (SkQ1) on Contents of Steroid Hormones and NO Level in Rats. **Biochemistry (Moscow)**, v. 75, p. 1383-1387, 2010.

CLARKSON, J. et al. Neurobiological mechanisms underlying kisspeptin activation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neurons at puberty. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 324, n. 1-2, p. 45-50, 2010.

CODO, W.; CARLINI, E. A. Postnatal undernutrition in rats: Attempts to develop alternative methods to food deprive pups without maternal behavioral alteration. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 12, n. 5, p. 475-484, 1979.

CORA, M. C.; KOOISTRA, L.; TRAVLOS, G.. Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. **Toxicologic pathology**, v. 43, n. 6, p. 776-793, 2015.

CURI, R.; PROCÓPIO, J. Fisiologia Básica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

DA SILVA FARIA, T. et al. Maternal malnutrition during lactation alters the folliculogenesis and gonadotropins and estrogen isoforms ovarian receptors in the offspring at puberty. **Journal of endocrinology**, v. 198, n. 3, p. 625-634, 2008.

DESAI, M. et al. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 1, p. R91-R96, 2005.

DE SOLIS, A. J. et al. Postnatal undernutrition delays a key step in the maturation of hypothalamic feeding circuits. **Molecular metabolism**, v. 5, n. 3, p. 198-209, 2016.

DJIANE, J.; ATTIG, L.. Role of leptin during perinatal metabolic programming and obesity. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, n. Suppl 1, p. 55-63, 2008.

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, 2016.

ENGELBREGT, M. J. T. et al. Delayed first cycle in intrauterine growth-retarded and postnatally undernourished female rats: follicular growth and ovulation after stimulation with pregnant mare serum gonadotropin at first cycle. **Journal of endocrinology**, v. 173, n. 2, p. 297-304, 2002.

ENGELBREGT, M. J. T. et al. Body mass index, body composition, and leptin at onset of puberty in male and female rats after intrauterine growth retardation and after early postnatal food restriction. **Pediatric research**, v. 50, n. 4, p. 474-478, 2001.

FALHOLT, K.; LUND, B.; FALHOLT, W. et al. An easy colorimetric micromethod for routine determination of free fat acids in plasma. **Clin. Chim. Acta**. v. 46, n. 2, p. 105-111, 1973.

FELIX, J. et al. Retrieval of pups by female rats undernourished during the pre-and neonatal period. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v. 2014, 2014.

FEDER, H. H.; MARRONE, B. L. Progesterone: its role in the central nervous system as a facilitator and inhibitor of sexual behavior and gonadotropin release. **Annals of the New York Academy of sciences**, v. 286, n. 1, p. 331-354, 1977.

FEDER, H. H.; RESKO, J. A.; GOY, R. W. Progesterone levels in the arterial plasma of pre-ovulatory and ovariectomized rats. **Journal of Endocrinology**, v. 41, n. 4, p. 563-569, 1968.

FIOROTTO, M. L. 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. R1104-R1113, 1991.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), International Fund for Agricultural Development (IFAD), United Nations Children's Fund (UNICEF), World Food Programme (WFP), World Health Organization (WHO). **The State of Food Security and Nutrition in the World: Safeguarding against economic slowdowns and downturns** Rome: FAO; 2022

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). **Sustainable Development Goals**. 2023. Disponível em: <<https://www.fao.org/sustainable-development-goals/indicators/211/en/>>. Acesso em: 6 fev 2023.

GALLAVAN, J. R., ROBERT, H. et al. Interpreting the toxicologic significance of alterations in anogenital distance: potential for confounding effects of progeny body weights. **Reproductive toxicology**, v. 13, n. 5, p. 383-390, 1999.

GUARRACI, F. A.; BOLTON, J. L. “Sexy stimulants”: The interaction between psychomotor stimulants and sexual behavior in the female brain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 121, p. 53-61, 2014.

HARDY, D. F.; DEBOLD, J. F. Effects of mounts without intromission upon the behavior of female rats during the onset of estrogen-induced heat. **Physiology & Behavior**, v. 7, n. 4, p. 643-645, 1971.

HELLIER, V.; BROCK, O.; BAKKER, J.. The role of Kisspeptin in sexual behavior. In: **Seminars in reproductive medicine**. Thieme Medical Publishers, 2019. p. 084-092.

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

JIMENEZ-CHILLARON, J. C. et al. Reductions in caloric intake and early postnatal growth prevent glucose intolerance and obesity associated with low birthweight. **Diabetologia**, v. 49, p. 1974-1984, 2006.

KOMISARUK, B. R.; ADLER, N. T.; HUTCHISON, J. Genital sensory field: enlargement by estrogen treatment in female rats. **Science**, v. 178, n. 4067, p. 1295-1298, 1972.

KORNER, J. et al. Leptin Regulation of Agrp and Npy mRNA in the Rat Hypothalamus. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 13, p. 959-966, 2001.

LISBOA, P. C. et al. Postnatal low protein diet programs leptin signaling in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis and pituitary TSH response to leptin in adult male rats. **Hormone and Metabolic Research**, v. 44, n. 02, p. 114-122, 2012.

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

- LÓPEZ-SOLDADO, I. MUNILLA, M. A.; HERRERA, E.. Long-term consequences of under-nutrition 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.
- MARANGON, P. B. et al. Perinatal over-and underfeeding affect hypothalamic leptin and ghrelin neuroendocrine responses in adult rats. **Physiology & behavior**, v. 215, p. 112793, 2020..
- MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. **Brazilian journal of biology**, v. 62, p. 609-614, 2002.
- MATSUZAKI, T. et al. Prenatal undernutrition suppresses sexual behavior in female rats. **General and Comparative Endocrinology**, v. 269, p. 46-52, 2018.
- MMI, A. Central and peripheral control of food intake. **Endocrine Regulations**, v. 51, n. 1, p. 52-70, 2017.
- MONTAGNINI, B. G. et al. Reproductive parameters of female Wistar rats treated with methylphenidate during development. **Physiology & Behavior**, v. 167, p. 118-124, 2016.
- MONTAGNINI, B. G. et al. Investigation of the potential effects of triclosan as an endocrine disruptor in female rats: Uterotrophic assay and two-generation study. **Toxicology**, v. 410, p. 152-165, 2018.
- MYERS, M. M. et al. Maternal behavior of SHR rats and its relationship to offspring blood pressures. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 22, n. 1, p. 29-53, 1989.
- NATHAN, D. M. et al. Impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: implications for care. **Diabetes care**, v. 30, n. 3, p. 753-759, 2007.
- NUMAN, M. Motivational systems and the neural circuitry of maternal behavior in the rat. **Developmental Psychobiology: The Journal of the International Society for Developmental Psychobiology**, v. 49, n. 1, p. 12-21, 2007.
- PASSOS, M. C. F. et al. Long-term effects of malnutrition during lactation on the thyroid function of offspring. **Hormone and metabolic research**, v. 34, n. 01, p. 40-43, 2002.
- PALOU, M. et al. Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. **Nutrition & metabolism**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2010.
- PALOU, M. et al. Moderate caloric restriction in lactating rats protects offspring against obesity and insulin resistance in later life. **Endocrinology**, v. 151, n. 3, p. 1030-1041, 2010b.
- PATTERSON, C. M. et al. Large litter rearing enhances leptin sensitivity and protects selectively bred diet-induced obese rats from becoming obese. **Endocrinology**, v. 151, n. 9, p. 4270-4279, 2010.

PICÓ, C. et al. Metabolic programming of obesity by energy restriction during the perinatal period: different outcomes depending on gender and period, type and severity of restriction. **Frontiers in physiology**, v. 3, p. 436, 2012.

PLAGEMANN, A. Perinatal nutrition and hormone-dependent programming of food intake. **Hormone Research in Paediatrics**, v. 65, n. Suppl. 3, p. 83-89, 2006.

PLAGEMANN, A. A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 21, n. 3, p. 143-148, 2008.

PLANT, T. M. The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. **The Journal of endocrinology**, v. 226, n. 2, p. T41, 2015.

POWERS, J. B. Hormonal control of sexual receptivity during the estrous cycle of the rat. **Physiology & Behavior**, v. 5, n. 8, p. 831-835, 1970.

PRIOR, L. J. 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.

REMMERS, F.; FODOR, M.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. **Physiology & behavior**, v. 95, n. 1-2, p. 208-215, 2008.

REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocrine reviews**, v. 32, n. 2, p. 272-311, 2011.

RIVEST, R. W. Sexual maturation in female rats: hereditary, developmental and environmental aspects. **Experientia**, v. 47, p. 1026-1038, 1991.

ROA, J. et al. Metabolic control of puberty onset: new players, new mechanisms. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 324, n. 1-2, p. 87-94, 2010.

ROSENBLATT, J. S.; MAYER, A. D.; GIORDANO, A. L. Hormonal basis during pregnancy for the onset of maternal behavior in the rat. **Psychoneuroendocrinology**, v. 13, n. 1-2, p. 29-46, 1988.

SALAS, M. et al. Maternal Response of Perinatally Underfed Wistar Virgin Females Exposed to Newborn Rats. **Journal of Behavioral and Brain Science**, v. 9, n. 3, p. 78-89, 2019.

SALCEDO, C. et al. Effects of pre-and neonatal undernutrition on the kyphotic response and c-Fos activity in the caudal periaqueductal gray of primiparous lactating Wistar rats. **Physiology & behavior**, v. 185, p. 87-94, 2018.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661-671, 2000.

ŠEFČÍKOVÁ, Z.; MOZEŠ, Š. Effect of early nutritional experience on the feeding behaviour of adult female rats. **Veterinary Medicine (Praha)**, v. 47, p. 315-322, 2002.

SILVA, A. E.; SERAKIDES, R.; CASSALI, G. D. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, p. 625-633, 2004.

SILVEIRA, P. P. et al. Developmental origins of health and disease (DOHaD). **Jornal de pediatria**, v. 83, p. 494-504, 2007.

SILVERTHORN, D. U.. *Fisiologia Humana: uma abordagem integrada*. 7 ed. Santana: ArtMed, 2016.

SMITH, J. T.; SPENCER, S. J. Prewaning over-and underfeeding alters onset of puberty in the rat without affecting kisspeptin. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 5, p. 145, 1-8, 2012.

SMITH, M. S.; FREEMAN, M. E.; NEILL, J. D. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. **Endocrinology**, v. 96, n. 1, p. 219-226, 1975.

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, 2021.

TAKAHASHI, K. A.; CONE, R. D. Fasting induces a large, leptin-dependent increase in the intrinsic action potential frequency of orexigenic arcuate nucleus neuropeptide Y/Agouti-related protein neurons. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1043–1047, 2005.

TERASAWA, E.; GUERRIERO, K. A.; PLANT, T. M. Kisspeptin and puberty in mammals. **Kisspeptin signaling in reproductive biology**, p. 253-273, 2013.

VICKERS, M. H. et al. Fetal origins of hyperphagia, obesity, and hypertension and postnatal amplification by hypercaloric nutrition. **American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism**, v. 279, n. 1, p. E83-E87, 2000.

VICTORA, C. G. et al. Maternal and child undernutrition: consequences for adult health and human capital. **The lancet**, v. 371, n. 9609, p. 340-357, 2008.

WATERLAND, R. A.; GARZA, C. Early postnatal nutrition determines adult pancreatic glucose-responsive insulin secretion and islet gene expression in rats. **The Journal of nutrition**, v. 132, n. 3, p. 357-364, 2002.

WEAVER, I. C. G et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nature neuroscience**, v. 7, n. 8, p. 847-854, 2004.

YEH, Y. 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. 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.

ZEMLAN, F. P.; ADLER, N. T. Hormonal control of female sexual behavior in the rat. **Hormones and behavior**, v. 9, n. 3, p. 345-357, 1977.

ANEXO A

Cópia do parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais para Experimentação da UEL



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 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 n° 18310.2019.03 sob a responsabilidade de **Ermane 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 n° 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n° 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
N° 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-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/Uel anteriormente à execução das modificações.

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.ª Dr.ª 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). **Ermane 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