



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO (UFOP)
ESCOLA DE NUTRIÇÃO (ENUT)
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS (DEALI)



THAÍS ARAÚJO BARUD

**EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS
SIMPLES SOBRE O GRAU DE ADIPOSIDADE E METABOLISMO DE RATOS
JOVENS**

Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO (UFOP)
ESCOLA DE NUTRIÇÃO (ENUT)
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS (DEALI)



THAÍS ARAÚJO BARUD

**EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS
SIMPLES SOBRE O GRAU DE ADIPOSIDADE E METABOLISMO DE RATOS
JOVENS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial para obtenção de grau em Bacharel em Nutrição pela Universidade Federal de Ouro Preto.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Karina Barbosa de Queiroz

Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

2024

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

B295e Barud, Thais Araujo.
Efeitos da redução da ninhada e da dieta rica em carboidratos simples sobre o grau de adiposidade e metabolismo de ratos jovens. [manuscrito]
/ Thais Araujo Barud. - 2021.
64 f.

Orientadora: Profa. Dra. Karina Queiroz.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Nutrição. Graduação em Nutrição .

1. Programação metabólica. 2. Carboidratos. 3. Resistência à insulina.
4. Tecido adiposo branco.. I. Queiroz, Karina. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 613.2

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/22



FOLHA DE APROVAÇÃO

THAÍS ARAÚJO BARUD

EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DA DIETA RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES SOBRE O GRAU DE ADIPOSIDADE E METABOLISMO DE RATOS JOVENS

Monografia apresentada ao Curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de Nutricionista

Aprovada em 14 de outubro de 2024

Membros da banca

Doutora - Karina Barbosa de Queiroz - Orientadora - Universidade Federal de Ouro Preto
Doutora - Silvia de Paula Gomes - Universidade Federal de Ouro Preto
Mestre - Miliane Martins de Andrade Fagundes - Universidade Federal de Ouro Preto

Karina Barbosa de Queiroz, orientadora do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito na Biblioteca Digital de Trabalhos de Conclusão de Curso da UFOP em 14/10/2024



Documento assinado eletronicamente por **Karina Barbosa de Queiroz, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 17/10/2024, às 08:12, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0796107** e o código CRC **685E5BF7**.

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial à minha mãe, aos meus avós, ao meu noivo e aos meus filhos, a minha turma de Nutrição 16.2 e a todos que contribuíram com a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Sempre quando achamos que conhecemos o futuro, ele se modifica, podendo parecer um túnel sombrio. Entretanto, é preciso acreditar que ao final desse túnel cheio de medos e inseguranças estará um futuro brilhante. E foi nisso que eu acreditei quando comecei o curso de Nutrição da Universidade Federal de Ouro Preto.

Ser Nutricionista em 2016 era apenas um sonho, que começava ali a se tornar realidade, a cada professor, a cada matéria e a cada semestre que se passava, eu ficava mais perto de realizar esse grande sonho. Agora, estou diante de mais um desafio para alcançar o momento mais almejado por um estudante: a formatura. Mas, nada disso seria possível se eu não tivesse sido amparada por uma rede de pessoas, e é por isso que venho hoje agradecer.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por ter me dado saúde, força e por ter guiado meus passos até aqui; sem Ele, talvez eu nunca tivesse trilhado esse caminho.

Agradeço a minha família, por me tolerar e amar todos esses anos, mas, em especial, agradeço à minha mãe Simone, por sempre ter investido na minha educação, por ter sido guerreira e ter criado dois filhos sozinha: te amo muito! Ao meu avô Paulo Tadeu, que plantou esse sonho e me mostrou que a educação é tudo que vamos levar conosco para o resto de nossas vidas. Hoje ele está ao lado de Deus e infelizmente não está fisicamente ao meu lado no dia de hoje, mas sei que ele continua guiando meus passos. À minha avó Maria Beatriz, que sempre foi uma guerreira. Com ela aprendi que mulheres não foram feitas para ficarem em casa, que podemos ser o que quisermos: obrigada Vovó. Ao meu noivo Luiz Filipe, por me ajudar sempre, e estar ao meu lado nos momentos em que eu achei que não suportaria, que não teria forças para prosseguir: muito obrigada por acreditar em mim! Ao meu filho João Pedro, por ser a criança mais madura, inteligente e amorosa do mundo: obrigada principalmente por entender o porquê de a mamãe ter que dividir a atenção que deveria ser somente sua com os estudos. À Maria Clara, que chegou no finalzinho desse processo, mas foi a minha parceira de escrita e me rendeu nos momentos de exaustão. Obrigada também ao meu irmão Wester e à minha prima Isadora, por estarem ao meu lado a vida toda: não seria nada sem vocês! À minha sobrinha Livia, por acreditar que eu sou a pessoa mais inteligente do mundo: titia te ama demais.

Agradeço aos amigos antigos, que permaneceram ao meu lado mesmo depois de muitas mudanças. Vocês são, em parte, responsáveis pela mulher que venho me tornando. Aos amigos que fiz na faculdade; à minha turma maravilhosa 16.2, em especial à Isabela Marangon, à Larissa Rodrigues, à Kelly, à Miriam, à Luisa, à Luanna e à Camila Laisa.

Obrigada 16.2 pelas risadas, pelos “memes”, pela ajuda antes das provas, por aguentarem o meu desespero antes das provas; nós estamos quase lá e a minha conquista é de vocês também. Sou muito grata também por ter feito parte do Centro Acadêmico Livre de Nutrição, a chapa Uninutri me ensinou muito, e com cada uma de vocês (Lara, Lorrana, Tatiane, TÁCila, Jussara e Renata) aprendi alguma coisa que me fez ver a Nutrição com outro olhar e vou levar todas para o resto da minha vida, a nossa chapa foi a coisa mais especial que me aconteceu nos anos da faculdade.

Agradeço aos professores que tive durante a vida, e aos que me acompanharam nessa jornada que foi a faculdade. Em especial agradeço à Karina Barbosa, que acreditou em mim em momentos que nem eu mesma acreditei; obrigada Karina, pelos puxões de orelha, pela cobrança, tudo isso me fez estar um passo mais próxima do futuro que almejo.

Agradeço também ao meu laboratório LABNEX e a todos os membros, em especial à Miliane Martins, que sempre esteve pronta para ajudar no que fosse preciso. À Isabela Jesus, que compartilhou comigo todo o processo de construção, de sofrimento e de alegria; chegamos juntas até aqui e sem você eu não teria conseguido.

Agradeço a todos os laboratórios que me apoiaram, ajudaram e guiaram durante esse tempo, em especial: ao Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) e à professora Daniela Caldeira; ao Laboratório de Bromatologia, à professora Melina Oliveira e ao técnico Rafael Antônio; ao Centro de Ciência Animal (CCA) e à Ângela Antunes; ao Laboratório de Imunopatologia (LIMP) e à professora Cláudia Martins. Obrigada por tornarem meu projeto possível.

Aos animais experimentais: me apeguei demais a vocês e por isso as eutanásias foram tão dolorosas. Acredito que foi uma das coisas mais difíceis que fiz durante esse tempo, mas foi também a que mais me ensinou, me tornaram mais humana.

Por fim, agradeço à UFOP e à Escola de Nutrição por todas as oportunidades que me foram oferecidas. Especialmente, ao Programa de Iniciação à Pesquisa (PIP), por financiar a minha bolsa de iniciação científica, e ao Auxílio Pesquisador da PROPPi, por acreditar nesse trabalho e me proporcionar o financiamento para realização do mesmo. A todos que, de uma forma direta ou indireta, participaram da realização desse sonho, a minha gratidão.

*As dificuldades é que preparam as pessoas comuns para destinos
extraordinários. (C. S. Lewis)*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Primeira fase do delineamento experimental.....	28
Figura 2 - Segunda fase do delineamento experimental.....	29
Figura 3 - Efeito da redução da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame.....	36
Figura 4 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre a ingestão calórica, sobre o ganho de massa corporal e sobre a eficiência alimentar após 8 semanas.....	38
Figura 5 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre os parâmetros glicometabólicos após 8 semanas	41
Figura 6 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre o perfil lipídico sérico após 8 semanas.....	43
Figura 7 -Efeito da redução da ninhada e da dieta HS sobre os parâmetros biométricos após 8 semanas.....	45
Figura 8 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre o peso relativo e o percentual de lipídeos do TAR após 8 semanas	47
Figura 9 - Efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da dieta HS sobre o grau de adiposidade e metabolismo de ratos jovens	50

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

AB, Absorbância

AD, Adipócito

AG, Ácidos Graxos ALP – Fosfatase Alcalina

ANOVA, Análise de Variância

AOAC, *Association Of Official Analytical Chemists*

ATP, Adenosina trifosfato

BP, Pressão Arterial

C/EBPs, Proteína de ligação de CCAAT

CCA, Centro de Ciência Animal

CEA, Coeficiente de Eficiência Alimentar

CGPCC, Coeficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico

CNA, Comprimento naso-anal

CoA, Coenzima A

DCN, Doenças Crônicas Não Transmissíveis

DNA, Ácido Desoxirribonucleico

ELISA, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

GLI, Glicose sérica

H₃BO₃, Ácido bórico HCL, Ácido clorídrico

HDL, Lipoproteína de alta densidade

HOMA-IR, Índice Homeostático de Resistência à

HS, Dieta Rica em Carboidratos Simples

HS-NC, grupo ninhada controle (8 filhotes/mãe) que recebeu dieta rica em carboidrato simples

HS-NR, grupo ninhada reduzida (4 filhotes/mãe) que recebeu dieta rica em carboidrato simples

ICEB, Instituto de Ciência Exatas e Biológicas

IL, Índice de Lee

INS, Insulina em jejum

IR, Resistência à Insulina

IQR, Intervalo interquartil

KLFs, Fatores semelhantes a Krumppel

LBM, Laboratório de Bioquímica Metabólica

LDL, Lipoproteína de Baixa Densidade

LIMP, Laboratório de Imunopatologia

NaOH, Hidróxido de sódio
NC, Ninhada Controle
NR, Ninhada Reduzida
NUPEB, Núcleo de Pesquisa de Ciências Biológicas
OMS, Organização Mundial da Saúde
PC, Peso Corporal
PIP, Programa de Iniciação à pesquisa
PROPPi, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação e Inovação
PTAR, Peso do tecido adiposo retroperitoneal
RI, Resistência à insulina
SREBP1, Fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1c
STD-NC, Grupo ninhada controle (8 filhotes/mãe) que recebeu a dieta NUVILAB®
STD-NR, Grupo ninhada reduzida (4 filhotes/mãe) que recebeu a dieta NUVILAB®
STD, Dieta padrão
TA, Tecido Adiposo
TAB, Tecido Adiposo Branco
TAE, Tecido adiposo epididimalTAG – Triacilglicerol
TAG, Triacilglicerol
TAI, Tecido adiposo inguinal TAM, tecido adiposo marrom
TAR, Tecido adiposo retroperitoneal
UFOP, Universidade Federal de Ouro Preto
VLDL, Lipoproteia de muito baixa densidade

RESUMO

O consumo excessivo de carboidratos simples pelas crianças em estágios críticos do desenvolvimento leva a respostas adaptativas, favorecendo o aparecimento de doenças crônicas na idade adulta, decorrentes do aumento do tecido adiposo branco (TAB). Esta relação é conhecida por programação metabólica. Existem indícios na literatura que a redução da ninhada pode influenciar o peso na vida adulta, bem como levar ao desenvolvimento de doenças crônicas. Entretanto, os mecanismos pelos quais a redução da ninhada e a dieta rica em carboidratos simples (dieta HS) interagem sobre a composição corporal na vida adulta precisam ser elucidados. Dessa forma, nos propomos a avaliar os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre o grau de adiposidade e metabolismo de ratos *Wistar* jovens. O modelo de redução da ninhada foi estabelecido conforme previamente publicado: 4 animais por ninhada – ninhada reduzida (NR) ou 8 animais para ninhada controle (NC). Após o desmame (21 dias), os animais foram novamente distribuídos em quatro grupos: (I) animais alimentados com a dieta padrão (STD) provenientes da ninhada NC (n=5; STD-NC); (II) animais alimentados com a dieta HS provenientes da ninhada NC (n=6; dieta HS- NC); (III) animais alimentados com STD provenientes da ninhada NR (n=6; STD-NR); (IV) animais alimentados com dieta HS provenientes da ninhada NR (n=6; dieta HS-NR). O grupo STD foi alimentado com ração comercial *Nuvilab*[®] e o grupo dieta HS foi alimentado por uma dieta “palatável” à base de leite condensado (33%). Os efeitos da dieta HS foram avaliados durante 8 semanas, nas quais foram mensurados a massa corporal dos animais e a ingestão alimentar. Ao final das 8 semanas, os animais foram eutanasiados e foi coletado o sangue para análises glicometabólicas e de lipídeos séricos, bem como o TAB para análises biométricas. O TA retroperitoneal (TAR) teve o teor de lipídeos totais e TAG mensurados. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram determinados pela ANOVA TWO-WAY, seguidos do pós-teste de *Bonferroni*. A manipulação do tamanho das ninhadas foi eficiente em induzir sobrepeso neonatal. Não houve diferença na massa corporal final dos animais, bem como no índice de Lee. A dieta HS reduziu a ingestão calórica independente da ninhada, influenciou o CEA e aumentou o CGPCC e o IA. O peso relativo do TAR aumentou nos grupos HS-NC e HS-NR. A dieta também influenciou a glicemia e aumentou as concentrações de insulina e HOMA-IR mostrando a eficiência da dieta HS em levar ao desenvolvimento da RI. A dieta HS foi responsável por alterar a composição corporal dos animais, aumentando teor de lipídeos e de TAG do TAR; entretanto, a interação entre as variáveis (tamanho da ninhada e dieta pós- desmame) reduziu o teor de lipídeos e de TAG no TAR no grupo HS-NR. A concentração de colesterol sérico foi influenciada pelo tamanho da ninhada, demonstrando a necessidade de experimentos futuros para elucidar este mecanismo. Dessa forma, nossos resultados sugerem que a interação entre a redução da ninhada e dieta HS exerce um efeito protetor no desenvolvimento da RI e do TAR, sugerindo a ocorrência de uma hiperplasia em detrimento da hipertrofia neste tecido. Entretanto, futuros experimentos são necessários para compreender o mecanismo por trás deste evento biológico.

Palavras-chave: programação metabólica, redução da ninhada, carboidratos simples, resistência à insulina, tecido adiposo branco.

ABSTRACT

Excessive simple carbohydrates intake by children at critical stages of development leads to adaptive responses, favoring the onset of chronic diseases in adulthood, resulting from the increase in white adipose tissue (BAD). This relationship is known as metabolic imprinting. There are evidences that litter effect may modulate adult body weight, as well as lead to the development of chronic diseases. However, the mechanisms by which litter size effect and a diet rich in simple carbohydrates (HS diet) interact on body composition in adulthood need to be elucidated. Thus, we propose to evaluate the effects of litter size and HS diet on the degree of adiposity and metabolism of young Wistar rats. The litter size effect model was established as previously published: 4 animals per litter – reduced litter (NR) or 8 animals for control litter (NC). After weaning (21 days), the animals were distributed into four groups: (I) animals fed the standard diet (STD) from the NC litter (n=5; STD-NC); (II) animals fed the HS diet from the NC litter (n=6; HS-NC diet); (III) animals fed with STD from the NR litter (n=6; STD-NR); (IV) animals fed with HS diet from the NR litter (n=6; HS-NR diet). The STD group was fed a commercial Nuvilab® chow and the HS diet group was fed a “palatable” condensed milk-based diet (33%). The effects of the HS diet were evaluated for 8 weeks, in which the animals' body mass and food intake were measured. At the end of 8 weeks, the animals were euthanized, and blood was collected for glycometabolic and serum lipid analyses, as well as the TAB for biometric analyses. Retroperitoneal AT (RAT) had the total lipid content and TAG measured. The effects of litter size and diet were determined by ANOVA TWO-WAY, followed by Bonferroni post-test. The manipulation of litter size was efficient in inducing neonatal overweight. There was no difference in the final body mass of the animals, as well as in the Lee index. The HS diet reduced the caloric intake regardless of the litter, influenced the CEA and increased the CGPCC and the AI. The relative weight of RAT increased in the HS-NC and HS-NR groups. The diet also influenced blood glucose and increased insulin and HOMA-IR concentrations, showing the efficiency of the HS diet in leading to the development of IR. The HS diet was responsible for altering the body composition of the animals, increasing the lipid and TAG content of the TAR; however, the interaction between the variables (litter size and post- weaning diet) reduced the lipid and TAG content in the RAT in the HS-NR group. Serum cholesterol concentration was influenced by litter size, demonstrating the need for future experiments to elucidate this mechanism. The interaction between litter size effect and HS diet exerts a protective effect on the development of IR and RAT, suggesting the occurrence of hyperplasia in detriment of hypertrophy. However, further experiments are needed to understand the mechanism behind this biological event.

Keywords: metabolic imprinting, litter size effect, high-sugar diet, insulin resistance, white adipose tissue.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA.....	21
2.1. PROGRAMAÇÃO METABÓLICA E OS SEUS MECANISMOS.....	21
2.2. CONSUMO EXCESSIVO DE CARBOIDRATO SIMPLES CAUSA AUMENTO DE TECIDO ADIPOSEO BRANCO, CULMINANDO EM RESISTÊNCIA À INSULINA.....	22
2.3. O TAMANHO DA NINHADA E A SUA RELAÇÃO COM A PROGRAMAÇÃO METABÓLICA.....	23
2.4. DESENVOLVIMENTO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO (TAB) E SUA RELAÇÃO COM O METABOLISMO.....	24
2.5. TAMANHO DA NINHADA, DIETA RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES E DESENVOLVIMENTO DO TAB.....	26
3. OBJETIVO GERAL.....	27
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. MODELO ANIMAL E DIETA.....	28
4.3. PARÂMETROS AVALIADOS.....	30
4.3.1. Ingestão calórica e cálculo da eficiência alimentar (CEA e CGPCC).....	30
4.3.2. Parâmetros glicometabólicos.....	31
4.3.2.1. Dosagem de glicose.....	31
4.3.2.2. Dosagem de insulina.....	31
4.3.2.3. Cálculo do índice HOMA-IR.....	32
4.3.3. Perfil lipídico sérico.....	32
4.3.3.1. Dosagem de colesterol total.....	32
4.3.3.2. Dosagem de triacilglicerol (TAG).....	33
4.3.4. Parâmetros Biométricos.....	33
4.3.4.1. Índices de Lee e de Adiposidade (IA).....	33

4.4. PESO RELATIVO DO TAR	18
4.4. PESO RELATIVO DO TAR	34
4.5. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAL NO TAR	34
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1. EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A MASSA CORPORAL PÓS-DESMAME.....	36
5.2. EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DA DIETA HS SOBRE O COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR (CEA) E SOBRE O COEFICIENTE DE GANHO DE PESO POR CONSUMO CALÓRICO (CGPCC) APÓS 8 SEMANAS	37
5.3. EFEITOS DO TAMANHO DA NINHADA E DA DIETA HS SOBRE OS PARÂMETROS GLICOMETABÓLICOS APÓS 8 SEMANAS	40
5.4. EFEITOS DA MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA E DO CONSUMO DA DIETA HS SOBRE PERFIL LIPÍDICO SÉRICO APÓS 8 SEMANAS	42
5.5. EFEITOS DO TAMANHO DA NINHADA E DA DIETA HS SOBRE OS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS APÓS 8 SEMANAS.....	45
5.6. EFEITOS DA MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA E DO CONSUMO DA DIETA HS SOBRE O PESO RELATIVO E O PERCENTUAL DE LIPÍDEOS NO TAR.....	46
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7. REFERÊNCIAS.....	52
8. ANEXOS	60
ANEXO 1- CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	60
ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER NO CONGRESSO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, CONAN, 2019	61
ANEXO 3 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER NO XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFOP - ENCONTRO DOS SABERES (SEIC), 2019.....	62

1. INTRODUÇÃO

Programação metabólica é um acontecimento biológico que determina a associação entre eventos físico-químicos no início da vida e suas consequências futuras⁽¹⁾, sendo caracterizada por respostas adaptativas que envolvem a experiência nutricional inicial e o desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta (DCNT)^(2,3). Esse fenômeno está relacionado a modificações epigenéticas⁽³⁾, tais como metilação de DNA, modificações pós-traducionais de histonas e modulação da expressão de uma variedade de RNAs não-codificantes (miRNAs)^(4,5), podendo ocorrer durante as janelas críticas do desenvolvimento, como o crescimento fetal, período neonatal e as “transições da dieta” que ocorrem ao longo da vida⁽³⁾, sendo que a ingestão excessiva de lipídeos ou restrição calórica crônica também são descritas na literatura^(1,3,6).

A obesidade infantil vem aumentando rapidamente nas últimas décadas e vem sendo considerada uma epidemia mundial e um dos principais problemas de saúde pública⁽⁷⁾. A Organização Mundial da Saúde (OMS) tem mostrado que a alimentação infantil vem sendo baseada principalmente em carboidratos simples, como por exemplo, o açúcar, que é amplamente utilizado pela indústria nos produtos destinados ao público infantil⁽⁸⁾. Essa fonte energética é considerada pobre em vitaminas e minerais e possui alta densidade calórica. O excedente de carboidrato vindo da dieta, desencadeia processos inflamatórios levando a um aumento na lipogênese no TAB⁽⁹⁾, dessa forma, os ácidos graxos serão utilizados para de síntese de triacilglicerol (TAG), que será armazenado principalmente no TAR⁽¹⁰⁾. Além disso, haverá maior disponibilidade de ácidos graxos saturados na corrente sanguínea pode causa deposição ectópica de lipídeos no fígado e músculo⁽⁹⁾. Essa maior disponibilidade de ácidos graxos saturados ativa mecanismos responsáveis por prejudicar o metabolismo da glicose, levando a alterações na sinalização da insulina^(11,12).

A lactação promove a nutrição adequada do recém-nascido, além de reduzir a mortalidade infantil, sugerindo um efeito protetor. Acredita-se que a composição do leite materno induz respostas adaptativas, favorecendo modificações na deposição de gordura no TAB⁽¹³⁾. Estudos experimentais vêm demonstrando que a redução do tamanho da ninhada altera o comportamento alimentar dos animais, devido a uma redução na competição pelo alimento⁽¹⁴⁾. A maior oferta do leite induz um maior aporte energético, e, por consequência, uma superalimentação precoce. O período neonatal

imediatamente é considerado uma janela de oportunidade, visto que o sistema neuroendócrino está em desenvolvimento, sendo a superalimentação então capaz de acarretar alterações estruturais e funcionais permanentes no sistema nervoso^(14,15).

Nesse contexto, superlactação e ingestão excessiva e precoce de carboidratos simples são alguns fatores que podem levar a uma programação metabólica^(16,17), promovendo maior deposição de lipídeos no TAB, via hipertrofia (aumento do tamanho das células) ou hiperplasia (aumento do número de células) dos adipócitos⁽¹⁸⁾, o que pode culminar no desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades em adultos jovens^(16,17). No entanto, a relação entre a redução da ninhada e o desenvolvimento do TAR em ratos submetidos a dieta rica em carboidratos simples ainda não foi estabelecida.

Resultados do nosso grupo demonstraram que a dieta rica em carboidrato simples é capaz de aumentar o tamanho dos depósitos de gordura⁽¹⁷⁾, causando hipertrofia, sem alterar o ganho de massa corporal total⁽¹⁹⁾, além de interferir na sensibilidade à insulina, levando a RI, após 8 semanas de consumo^(17,20). O modelo de manipulação do tamanho da ninhada, caracterizado pela redução das ninhadas, resulta em animais significativamente mais pesados com um perfil distinto de inflamação^(20,21). A manipulação do tamanho da ninhada pode resultar numa resposta diferenciada mediante o estímulo obesogênico e os impactos dessa sensibilização no surgimento da RI induzida por dieta rica em carboidratos simples permanecem por serem elucidados. A partir dessas descobertas, fomos motivados a investigar se os efeitos da redução da ninhada e da dieta rica em carboidrato simples levariam a uma programação metabólica no TAR. Dessa forma, o estudo visa a elucidar se a redução das ninhadas associada ao consumo de dieta rica em carboidrato simples por 8 semanas levaria a uma atenuação da RI, bem como modificaria a dinâmica de deposição de gordura no TAR.

2. FUNDAMENTAÇÃO CIENTÍFICA

2.1. PROGRAMAÇÃO METABÓLICA E OS SEUS MECANISMOS

Epigenética é o conceito dado a alterações reversíveis na estrutura da cromatina, causadas por fatores ambientais, sem que ocorra alterações na estrutura do DNA. Essas alterações são responsáveis pela regulação da expressão de genes envolvidos com processos fisiopatológicos^(3,22). Programação metabólica refere-se às respostas adaptativas que descrevem as relações entre a experiência nutricional durante o início da vida e o aparecimento de doenças crônicas na idade adulta^(1,2). O desenvolvimento humano é marcado por fases de extrema importância (período fetal, período neonatal e transição de dietas) conhecidas como janelas de oportunidades, onde alterações fisiológicas e morfológicas estão em evidência, sendo assim são períodos com maior vulnerabilidade à programação metabólica^(2,3). É um mecanismo de sobrevivência da prole em condições adversas, principalmente em condições de desnutrição, visando a melhor utilização dos nutrientes disponíveis. Entretanto, a longo prazo, essas respostas adaptativas a um momento de restrição crônica poderão determinar o aparecimento de doenças na idade adulta⁽²³⁾.

Mecanismos metabólicos e fisiológicos estão envolvidos no processo da programação, destacando-se entre eles modificações na estrutura do TA, levando ao aumento do número de células adiposas e diferenciação metabólica (hiperplasia), causadas por alterações na expressão gênica, promovendo alterações hormonais e enzimáticas^(2,22). Dessa forma a origem deste fenômeno está relacionada às modificações epigenéticas, como metilação de DNA, modificações pós-traducionais de histonas e modulação da expressão de uma variedade de RNAs não-codificantes (miRNAs)⁽⁵⁾. Em animais vertebrados a metilação do DNA ocorre quase que exclusivamente em dinucleotídeos. As histonas estão sujeitas a diversas modificações pós-traducionais, incluindo acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação, além disso, parecem recrutar enzimas para regiões específicas do genoma⁽²²⁾.

A literatura vem demonstrando a capacidade do estresse nutricional durante os períodos críticos do desenvolvimento levar a alterações na fisiologia e no metabolismo de um organismo, aumentando, assim, a probabilidade do desenvolvimento de doenças em longo prazo⁽²⁴⁾. Durante as janelas de oportunidade, a disponibilidade de nutrientes vindos da dieta, tanto em quantidades insuficientes quanto excedentes⁽²⁴⁾, podem levar a uma programação do metabolismo, levando, assim, ao desenvolvimento da obesidade e

suas comorbidades na vida adulta⁽²⁵⁾. Essa ideia surge com a hipótese da origem fetal, proposta por Baker⁽²⁶⁾. Assim, se as exigências fetais, por exemplo, não forem atendidas, com o fornecimento de nutrientes em quantidade e qualidade adequadas, o crescimento normal, o desenvolvimento e o metabolismo podem ser prejudicados, levando a consequências à saúde a longo prazo⁽²⁴⁾.

2.2. CONSUMO EXCESSIVO DE CARBOIDRATO SIMPLES CAUSA AUMENTO DE TECIDO ADIPOSE BRANCO, CULMINANDO EM RESISTÊNCIA À INSULINA

Os nutrientes vindos da dieta são capazes de alterar o padrão de transcrição gênica por meio de modificações epigenéticas, pois geram substratos, além de alterar sua disponibilidade. Isso nos sugere que a intervenção nutricional é uma forma de reprogramar o epigenoma e controlar a saúde⁽²⁷⁾.

A composição da dieta tem um papel fundamental na gênese da obesidade^(28,29), sendo mostrado em alguns estudos que o consumo de dietas hiperlipídicas vem levando ao desenvolvimento da patologia⁽¹⁵⁾. Assim como os efeitos metabólicos da patologia, os fatores ambientais, como estilo de vida, alimentação, prática de atividade física, também são relacionados ao desencadeamento da obesidade na vida adulta⁽³⁰⁾. De acordo com a OMS⁽⁸⁾, a transformação do perfil nutricional pode ser caracterizada, principalmente, pela diminuição dos níveis de atividade física, devido ao grande contato com eletrônicos, como televisão, computadores e celulares, bem como o alto consumo de alimentos ricos em gordura (alimentos com alta densidade calórica) e pobre em vitaminas e minerais⁽³¹⁾.

O consumo excessivo de carboidratos simples nas primeiras fases da vida vem sendo descrito como um fator de risco para o desenvolvimento da obesidade na vida adulta^(31,32). Excesso de carboidratos simples na alimentação exerce grande influência no TAB, devido sua via de utilização no corpo⁽¹⁰⁾. O carboidrato vindo da dieta é utilizado como fonte energética (via glicolítica) ou armazenado, principalmente, no TAB, via síntese de TAG (lipogênese)⁽³³⁾.

Após uma refeição rica em carboidrato simples, com balanço energético positivo, há uma grande disponibilidade de glicose na corrente sanguínea. Para que essa glicose vinda da dieta seja metabolizada, as células pancreáticas liberam insulina, um hormônio anabólico, responsável por ativar a via glicolítica nos tecidos alvos como

Músculo esquelético e TAB. A insulina atua estimulando a translocação de GLUT4, em um transportador de glicose, que é armazenado em vesículas intracelulares e, quando ativado, migra para a membrana plasmática. No citoplasma, a glicose é fosforilada pela hexoquinase, iniciando a via glicolítica, que converte a glicose em piruvato.

O piruvato entra na mitocôndria e é convertido em Acetil-CoA pela ação da enzima piruvato-desidrogenase. O Acetil-CoA segue para o ciclo do ácido cítrico, onde é convertido em citrato e há produção de ATP. Na presença de muito ATP e citrato, o citrato é enviado novamente para o citosol, onde é convertido em Acetil-CoA e utilizado na síntese de ácidos graxos por meio da ação da enzima acetil-CoA carboxilase, gerando Malonil-CoA. Esse processo dá início à síntese de ácidos graxos, culminando na produção de palmitato, precursor de ácidos graxos saturados de cadeia longa. Esses ácidos graxos são conjugados com glicerol para formar triacilglicerol (TAG), que será armazenado no TAB.

O consumo excessivo de carboidratos simples promove a lipogênese e a deposição de ácidos graxos no TAB, culminando em aumento do tecido adiposo⁽³⁴⁾. Com a síntese de TAG aumentada, há o aumento também de ácidos graxos livres^(33,35), que podem levar a hipertrofia do adipócito. Esse processo de hipertrofia está associado à secreção de citosinas inflamatórias e a resistência à insulina (RI), pois a sinalização da insulina é prejudicada, devido a uma falha na translocação do GLUT4 para a membrana celular, o que reduz a captação de glicose do músculo esquelético e do TAB, favorecendo uma RI⁽³⁶⁾.

2.3. O TAMANHO DA NINHADA E A SUA RELAÇÃO COM A PROGRAMAÇÃO METABÓLICA

Já está bem estabelecido pela literatura que a lactação pode acarretar diversos benefícios ao bebê^(2,13), como, por exemplo, promover a nutrição adequada do recém-nascido, além de garantir a homeostase energética ao longo da vida⁽²⁾ e, também, levar a redução da mortalidade infantil causada principalmente por doenças infecciosas⁽¹³⁾. Tais benefícios estão diretamente relacionados com o tempo de duração da lactação, com a introdução alimentar complementar e com a hipernutrição⁽³⁷⁾.

Com isso, parte da comunidade científica acredita que a alimentação infantil seria capaz de influenciar o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) na vida adulta⁽¹³⁾. O efeito protetor da lactação parece estar relacionado à composição nutricional e bioquímica do leite materno, em que substâncias bioativas, como ácido docosahexaenóico (DHA) e os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) regulam a deposição de gordura favorecendo as respostas metabólicas^(5,38). A literatura relata que a

alimentação materna durante a gestação e lactação pode alterar a composição do leite levando assim a maior propensão de distúrbios metabólicos⁽³⁹⁾. Considera-se, também, que o período de lactação como uma janela de oportunidade, devido ao mecanismo de plasticidade que a célula adiposa apresenta neste período, ou seja, a célula adiposa é capaz de regular o seu número (hiperplasia) e o seu tamanho (hipertrofia) em resposta a estímulos exógenos, como a superalimentação⁽³⁶⁾.

Além disso, estudos experimentais têm demonstrado que grande parte dos mamíferos continuam o desenvolvimento dos órgãos no período neonatal^(40,41), ou seja, o hipotálamo, durante as três primeiras semanas de vida, é imaturo⁽⁴²⁾, fazendo com que a regulação do metabolismo, responsável por inibir ou estimular o apetite, não ocorra da forma desejada^(43,44). Sendo assim, estudos têm sugerido que a dieta ofertada durante esse período pode estar envolvida com alterações permanentes^(45,46). Nessa perspectiva a redução do tamanho da ninhada pode afetar as respostas adaptativas caracterizando uma programação metabólica^(5,47).

Estudos vem demonstrando que a supernutrição no início da vida, pode influenciar o peso na vida adulta, bem como o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, hiperinsulinemia e sobrepeso^(40,48). Outra linha de pesquisa acredita que a programação metabólica possa acarretar um efeito protetor contra obesidade e diabetes *mellitus* na vida adulta^(2,13,49). Entretanto, os efeitos da redução da ninhada em longo prazo, ainda não estão bem estabelecidos, devido a estudos com resultados controversos.

2.4. DESENVOLVIMENTO DO TECIDO ADIPOSEO BRANCO (TAB) E SUA RELAÇÃO COM O METABOLISMO

Uma ingestão de nutrientes maior que as necessidades energéticas culminam em um balanço energético positivo, levando a um aumento de peso, principalmente pelo aumento do TAB^(36,50).

Em condições fisiológicas, está distribuído por todo o organismo, entretanto na obesidade, há um aumento principalmente do tecido adiposo visceral. Este, por sua vez, está intimamente relacionado ao desenvolvimento de doenças como a síndrome metabólica e a diabetes *mellitus*. O TAB é considerado um órgão endócrino, responsável por modular o apetite, regular o consumo energético, a sensibilidade à insulina, o sistema endócrino e reprodutivo, a inflamação e a imunidade⁽²⁶⁾. Além disso, tem como principal função sintetizar e armazenar lipídios, principalmente na forma de TAG⁽¹⁾.

A deposição de lipídeos no tecido, pode levar a alterações em sua conformação, levando a expansão do tecido. Essa expansão pode ocorrer de duas maneiras, na primeira há o aumento do tamanho da célula (hipertrofia) e na segunda há o aumento do número de células (hiperplasia).

A hipertrofia ocorre devido a ativação da lipogênese e da lipólise, levando a alterações de acordo com a necessidade do organismo de armazenar ou utilizar lipídios. Essa necessidade depende do estado nutricional, do gasto energético e do momento do metabolismo (hormônios catabólicos e anabólicos). Quando há uma grande disponibilidade de glicose, ocorre a síntese de ácidos graxos, que será conjugado com glicerol para a formação de TAG, para ser armazenados no TAB⁽⁵¹⁾. Ao atingir a capacidade máxima do adipócito em estocar lipídeos, a célula aumenta a hidrólise de TAG em ácidos graxos e glicerol (estímulo lipolítico). A lipólise então aumenta a quantidade de ácidos graxos, levando a hipóxia celular e o conteúdo da célula é difundido na corrente sanguínea. Essa hipóxia leva a uma maior concentração de ácidos graxos livres no plasma, e posterior deposição dos ácidos graxo em tecidos como fígado e músculo, causando uma lipotoxicidade⁽⁵²⁾.

Após a célula atingir o limiar de armazenamento de lipídeos através da hipertrofia, ocorre a hiperplasia. Isso se dá através da adipogênese, que é a formação de novos adipócitos a partir de uma célula precursora, aumentando assim a capacidade de armazenamento de energia do TAB⁽⁵²⁾. A célula precursora sofre uma diferenciação, passando de pré-adipócito e/ou de célula tronco mesenquimal a adipócito maduro. Esse processo é regulado por fatores de transcrição, sendo os principais proteína de ligação de CCAAT (C/EBPs), proliferador de peroxissoma γ (PPAR γ), fatores semelhantes a Kruppel (KLFs) e fator de transcrição de ligação ao elemento regulador de esterol 1c (SREBP1)⁽⁵²⁾. Quando há disponibilidade de insulina, ocorre a expressão da C/EBPs, fazendo com que o adipócito passe por uma divisão celular e posterior ativação da PPAR γ , levando a diferenciação de adipócitos e regulação de metabolismo, principalmente de carboidrato e lipídeos. Dessa forma, o C/EBPs e PPAR γ são considerados os reguladores centrais da adipogênese, já que uma vez expressos, eles são responsáveis por controlar as atividades do TA, bem como controlam a síntese e expressão de TAG⁽⁵³⁾.

A obesidade hipertrófica é a mais prejudicial, visto que na hipertrofia dos adipócitos eles expressam, produzem e liberam citocinas, deixando o tecido mais suscetível a processos inflamatórios⁽²⁶⁾. Além disso, sugere-se que a obesidade

hiperplásica é uma obesidade metabolicamente saudável, pois preservam as funções do TA, garantindo a homeostase corporal, favorecendo uma melhora nos processos inflamatórios causados pela obesidade hipertrófica, como por exemplo, levam a melhorias na sensibilidade a insulina, atenuando a RI⁽⁵²⁾.

2.5. TAMANHO DA NINHADA, DIETA RICA EM CARBOIDRATOS SIMPLES E DESENVOLVIMENTO DO TAB

Os efeitos da redução da ninhada vêm sendo usados para determinar os efeitos de uma superalimentação durante as primeiras fases da vida. O modelo proposto por Cryer & Jones consiste basicamente em separar após o nascimento os animais em dois grupos, sendo um grupo maior e um grupo menor. Tal metodologia, nos trouxe a ideia de modulação da composição corporal a partir das janelas críticas do desenvolvimento^(54,55). Dessa forma, a redução da ninhada seria capaz de influenciar o ganho de peso em ratos, além de influenciar a ingestão alimentar na vida adulta^(55,56).

Animais provenientes da ninhada reduzida, inicialmente, ganhariam mais peso quando comparados a animais de ninhadas maiores que apresentam crescimento mais lento; entretanto, após o desmame esse crescimento seria inibido^(55,56), e, ao longo da vida, a massa corporal dos animais de ambas as ninhadas se igualaria^(54,55). Indicando uma heterogeneidade nos padrões de crescimento de diferentes depósitos de TAB e susceptibilidade dos padrões para alterações induzidas por fatores genéticos e fatores ambientais⁽⁵⁴⁾, um exemplo é a capacidade de regulação da massa corporal a partir da oferta de alimentos, uma vez que animais de ninhadas reduzidas apresentam maior número de células (hiperplasia) quando comparados a animais que tinham uma oferta menor de alimentos durante o período de lactação^(18,56).

Além disso, a ingestão pós-desmame desses animais também é capaz de influenciar no processo de ganho de peso, sendo sugerido que um aumento da disponibilidade de nutrientes durante o desenvolvimento inicial pode levar ao número elevado de células adiposas^(55,56).

Diante o exposto até o momento, torna-se possível relacionar o tamanho da ninhada e o consumo de carboidrato simples como responsáveis por influenciar o desenvolvimento do TAB, sendo essa relação a hipótese proposta pelo trabalho.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da redução da ninhada e da dieta rica em carboidratos simples (HS) sobre o grau de adiposidade e metabolismo de ratos jovens.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para que o objetivo geral fosse alcançado, foram traçados os seguintes objetivos específicos:

- Determinar o modelo experimental da ninhada reduzida e sobrepeso neonatal;
- Avaliar os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS após 8 semanas sobre a ingestão calórica e a eficiência alimentar dos animais;
- Avaliar os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS após 8 semanas sobre os parâmetros glicometabólicos (glicose, insulina e HOMA-IR) dos animais;
- Determinar os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS após 8 semanas sobre o perfil lipídico sérico [colesterol total e triacilglicerol (TAG)] dos animais;
- Investigar os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS após 8 semanas sobre os parâmetros biométricos (ganho de massa corporal, índices de Lee e de adiposidade) dos animais;
- Estimar os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS após 8 semanas sobre o peso relativo, teor de gordura total e os níveis de TAG do TAR.

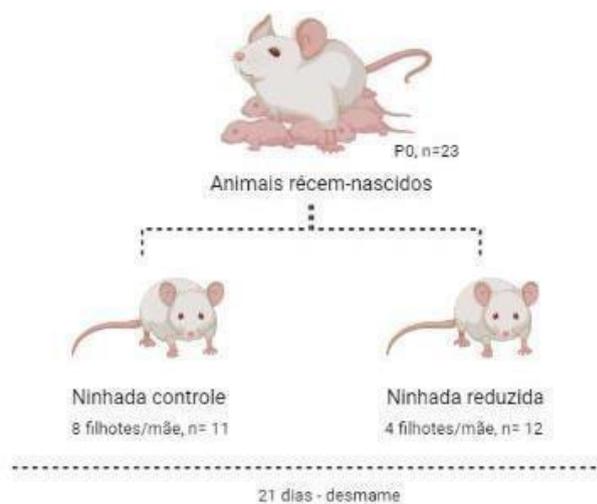
4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MODELO ANIMAL E DIETA

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), segundo o protocolo nº 2245040518 (Anexo 1).

Como demonstrado na Figura 1, foram utilizados 23 ratos Wistar machos provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. O modelo de redução do tamanho das ninhadas foi realizado conforme previamente publicado ^(20,57). Após o nascimento, os animais foram divididos randomicamente em dois grupos: o grupo ninhada controle (NC) era composto por 8 filhotes/ mãe (n=11) e o grupo ninhada reduzida (NR) era composto por 4 filhotes/mãe (n=12).

Figura 1 - Primeira fase do delineamento experimental.



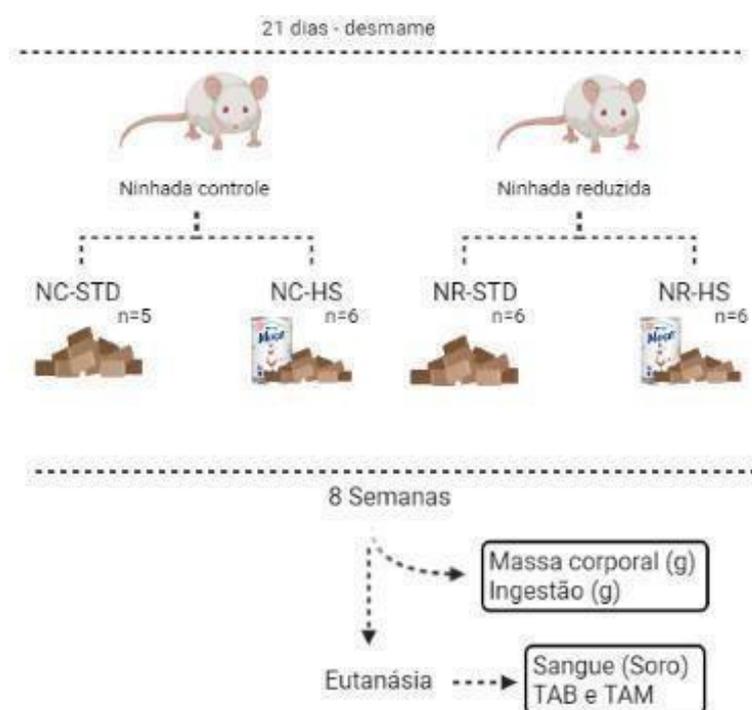
A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a Ninhada controle tinha 8 filhotes/mãe e a Ninhada reduzida tinha 4 filhotes/mãe ^(20,21).

Fonte: Elaboração própria, Bio Render, 2021. Disponível em <https://app.biorender.com/gallery/illustrations>. Acesso em 15 de junho de 2021.

Após o desmame (21 dias), os animais foram novamente distribuídos em quatro grupos: (I) animais alimentados com a dieta padrão (STD) provenientes da ninhada NC (n=5, STD-NC); (II) animais alimentados com a dieta rica em carboidrato simples (dieta HS) provenientes da ninhada NC (n=6, dieta HS-NC); (III) animais alimentados com dieta STD provenientes da ninhada NR (n=6, STD-NR); (IV) animais alimentados com

dieta HS provenientes da ninhada NR (n=6, dieta HS-NR). Os animais dos grupos I e III foram alimentados com a ração comercial padrão Nuvilab® (QUIMTIA, Paraná, Brasil) e os animais provenientes do grupo II e IV foram alimentados por uma dieta palatável à base de leite condensado, constituída por 33% de leite condensado Moça Nestlé®, 33% da ração padrão Nuvilab® (QUIMTIA), 7% de açúcar cristal e o remanescente de água⁵⁷. Os efeitos da dieta HS foram avaliados durante 8 semanas. O peso corporal dos animais foi mensurado semanalmente e o consumo alimentar foi mensurado três vezes por semana. A ingestão calórica foi obtida a partir da multiplicação do consumo alimentar semanal (em gramas) pela densidade energética das dietas STD e HS. Ao final do período experimental, foi realizada a eutanásia por decapitação e foram coletados o sangue e os tecidos adiposos retroperitoneal (TAR), inguinal (TAI), epididimal (TAE) e marrom (TAM), os quais foram armazenados em freezer -70°C até análises posteriores. As etapas experimentais estão demonstradas na Figura 2.

Figura 2 - Segunda fase do delineamento experimental.



A manipulação do tamanho das ninhadas foi feita como previamente publicado, na qual a Ninhada controle tinha 8 filhotes/ mãe e a Ninhada reduzida tinha 4 filhotes/ mãe^(20,21).

Fonte: Elaboração própria, Bio Render, 2021. Disponível em <https://app.biorender.com/gallery/illustrations>. Acesso em 15 de junho de 2021.

4.3. PARÂMETROS AVALIADOS

4.3.1. Ingestão calórica e cálculo da eficiência alimentar (CEA e CGPCC)

Para efetuar os cálculos da ingestão calórica, registrou-se a quantidade (em gramas) de ração consumida por cada animal. A quantidade de ração ofertada e a sobra da caixa foram pesadas três vezes na semana, durante as 8 semanas do experimento, em balança analítica (MARTE). Os valores obtidos foram somados e divididos pelo número de animais da mesma caixa (n=3), para que fosse possível estimar a ingestão alimentar total de cada animal. Após as análises bromatológicas, foi determinado o total de calorias fornecidas pelos macronutrientes das diferentes rações, sendo calculada a ingestão calórica. A ingestão calórica foi calculada pela fórmula abaixo. Além da ingestão total, também foram calculadas a semanal dos animais.

$$Ingestão\ calórica = Ia \times \%Kcal$$

Em que:

Ia: Ingestão alimentar

%Kcal: Teor calórico da dieta

Para mensurar a eficiência alimentar foram considerados o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e o coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC)⁽⁵⁸⁾. O CEA e o CGPCC foram mensurados a partir das fórmulas demonstradas abaixo:

$$CEA = \frac{Mcf - Mcpd}{IAT}$$

$$CGPCC = \frac{Mcf - Mcpd}{IC}$$

Em que:

Mcf: Massa corporal final

Mcpd: Massa corporal pós-desmame

IAT: Ingestão alimentar total

IC: ingestão calórica

4.3.2. Parâmetros glicometabólicos

4.3.2.1. Dosagem de glicose

Após a eutanásia, foi coletadas amostras de sangue em tubos *Falcons* (15 mL). As amostras foram centrifugadas (CENTRIBIO, Rio de Janeiro, Brasil) a $4.000 \times g$ por 10 minutos. Em seguida, o soro foi pipetado em *ependorfs* (2 mL), e reservado para as dosagens bioquímicas, realizadas no Laboratório de Bioquímica Metabólica (LBM) do Instituto de Ciências Exatas e Biológicas (ICEB) da UFOP, supervisionadas pela doutoranda Sttefany Viana Gomes e pela professora Daniela Caldeira Costa.

A dosagem de glicose sérica foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit Bioclin (BIOCLIN, Paraná, Brasil), conforme instruções do fabricante. Resumidamente, o método ocorre pela oxidação enzimática da glicose, no qual há liberação de peróxido de hidrogênio e formação de um cromógeno vermelho cereja. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra. Para realizar a dosagem, foi utilizado 5 ul de amostra de soro para 245 ul de reagente (diluição de 50×), em duplicata, pipetados em placa de Elisa (KASVI, Paraná, Brasil). A absorbância foi mensurada por espectrofotômetro (BIOSPECTRO, Paraná, Brasil), utilizando o comprimento de onda de 490nm (absortividade: 490-550nm). A concentração de glicose no plasma, foi dada pela fórmula apresentada abaixo:

$$Glicose = \frac{AB \text{ amostra}}{AB \text{ padrão}} \times 100$$

Em que:

AB = absorbância

Padrão = solução de glicose com concentração determinada pelo fabricante

4.3.2.2. Dosagem de insulina

A dosagem de insulina sérica foi realizada pelo método de quantificação não radioativa, utilizando o kit de ELISA para insulina de ratos (MILLIPORE, Darmstadt, Alemanha), conforme sugerido pelo fabricante. A leitura da absorbância foi realizada no espectrofotômetro (BIOSPECTRO), utilizando comprimento de onda 490nm. A concentração de insulina, foi dada por uma curva dose-resposta, em que foi plotado um gráfico de curva de referência de 450nm no eixo y e no eixo x continha as concentrações de insulina de ratos.

4.3.2.3. Cálculo do índice HOMA-IR

Para que fosse possível determinar se os animais que receberam a dieta rica em carboidrato simples desenvolveram RI após 8 semanas, a partir dos níveis séricos de insulina e glicose plasmática, descritos acima, calculamos o índice de resistência à insulina (HOMA) ⁽⁵⁹⁾, de acordo com a fórmula descrita abaixo:

$$HOMA = \frac{INS \times GLI}{22,5}$$

Em que:

HOMA: índice de resistência à insulina

INS: insulina de jejum

GLI: glicose sérica

4.3.3. Perfil lipídico sérico

4.3.3.1. Dosagem de colesterol total

A dosagem de colesterol sérica total foi realizada pelo método colorimétrico enzimático utilizando o kit comercial Labtest[®] (LABTEST, Minas Gerais, Brasil), conforme recomendações do fabricante. Basicamente, a dosagem ocorre a partir da hidrólise de ésteres de colesterol a colesterol livre + ácidos graxos, que então sofrem oxidação e são convertidos em peróxido de hidrogênio. O peróxido é novamente oxidado e forma antipirilquinonimina. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de colesterol presente na amostra. Para realizar a dosagem, foi utilizado 5 ul de amostra de soro para 245 ul de reagente (diluição de 50×), em duplicata, pipetados em placa de Elisa (KASVI). A absorbância foi mensurada por espectrofotômetro (BIOSPECTRO) utilizando comprimento de onda de 490nm (absortividade: 490-510nm). A concentração de colesterol no soro, foi dada pela fórmula apresentada abaixo:

$$Colesterol = \frac{AB \text{ amostra}}{AB \text{ padrão}} \times 200$$

Em que:

AB: absorbância

Padrão: solução de colesterol com concentração determinada pelo fabricante

4.3.3.2. Dosagem de triacilglicerol (TAG)

A dosagem de TAG sérica foi realizada pelo método colorimétrico enzimático utilizando o kit Labtest® (LABTEST), conforme recomendações do fabricante. Em resumo, o método ocorre pela hidrólise de TAG, com liberação de glicerol e conversão em glicerol-3-fosfato, resultando na produção de quinoneimina. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de TAG presente na amostra. Para realizar a dosagem, foi utilizado 5 ul de amostra de soro para 245ul de reagente (diluição de 50×), em duplicata, pipetados em placa de Elisa (KASVI). A absorbância foi mensurada por espectrofotômetro (BIOSPECTRO) utilizando comprimento de onda de 490nm (absortividade: 490-520nm). A concentração de colesterol total no soro foi dada pela fórmula representada abaixo:

$$TAG = \frac{AB \text{ amostra}}{AB \text{ padrão}} \times 200$$

Em que:

TAG: triacilglicerol

AB: absorbância

Padrão: solução de TAG com concentração determinada pelo fabricante

4.3.4. Parâmetros Biométricos

Para determinar se o modelo de manipulação do tamanho da ninhada foi eficiente em induzir ganho de massa corporal pós-desmame, bem como se a dieta HS induziu obesidade e RI, determinamos os parâmetros biométricos descritos a seguir.

4.3.4.1. Índices de Lee e de Adiposidade (IA)

Anterior a eutanásia, foram aferidos o comprimento naso-anal (CNA) e a massa corporal dos animais. Após a eutanásia, o peso dos coxins adiposos foi mensurado para determinar o grau de adiposidade pelo índice de Lee⁽⁶⁰⁾ e IA⁽⁵⁰⁾. As fórmulas estão representadas abaixo.

$$\text{Índice de Lee} = \frac{\sqrt[3]{PC}}{CNA}$$

$$\text{Índice de adiposidade} = \frac{\Sigma PCA}{PC} \times 100$$

Em que:

PC = Peso Corporal

CNA = Comprimento naso-anal

ΣPCA = Somatória dos pesos dos coxins adiposos (TAI, TAE, TAR, TAM)

4.4. PESO RELATIVO DO TAR

O peso relativo do TAR foi calculado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Peso relativo TAR} = \frac{PTAR}{PC}$$

Em que:

PTAR: Peso do TAR

PC: Peso corporal

4.5. EXTRAÇÃO DE LIPÍDEOS TOTAL NO TAR

A extração de lipídeos no TAR foi realizada pelo método descrito por Folch e col.⁽⁶¹⁾. O método consiste basicamente na extração física da gordura do TAR, no qual o lipídeo presente no tecido foi extraído pela ação dos solventes clorofórmio-metanol (2:1). Para realizar a extração, foram utilizados 100mg de TAR. As amostras foram homogeneizadas com solução de clorofórmio-metanol 2:1 (ALPHATEC). Em seguida, o homogenato foi transferido para um tubo previamente lavado com éter de petróleo (ALPHATEC) e seco em estufa (TECNAL-TE 393/2) por 24 horas a 37°C. Ao tubo foi acrescentados 46,71% mL de metanol (ALPHATEC) e, em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex (PHOENIX LUFERCO, São Paulo, Brasil) por 3 minutos. Posteriormente, foram centrifugadas (CENTRIBIO) a 3000 × g por 10 minutos. Depois de centrifugadas, ocorreu a formação de duas fases. O sobrenadante foi transferido para outro tubo previamente pesado e lavado como descrito acima, foi adicionado 0,8 mL de clorofórmio e 0,64 mL de NaCl 0,73%. A nova solução foi novamente centrifugada a 3000 × g por 10 minutos e, nessa etapa, o sobrenadante (solvente) foi descartado. Foi adicionado 1 mL da solução de Folch (para o preparo de 30 mL da solução de Folch, foi adicionado 14,69 mL de metanol, 0,98 mL de clorofórmio e 14,38 mL de água

destilada), em seguida as amostras foram deixadas em estufa (TECNAL-TE 393/2) a 80°C por 16 horas (evaporação do solvente). Ao final do experimento, os tubos foram novamente pesados e a quantidade de lipídios extraídos da amostra foi estimada pela fórmula abaixo:

$$\% \text{ Lipídeos} = \frac{\text{Massa de lipídeos (g)}}{\text{Massa da amostra (g)}} \times 100$$

Além do teor de lipídeos totais, foi determinado o teor de TAG. Para estas dosagens, as amostras foram ressuspendidas em 1 mL de isopropanol (ALPHATEC) e a análise foi realizada de acordo com a metodologia descrita anteriormente no item 4.4.3.2.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

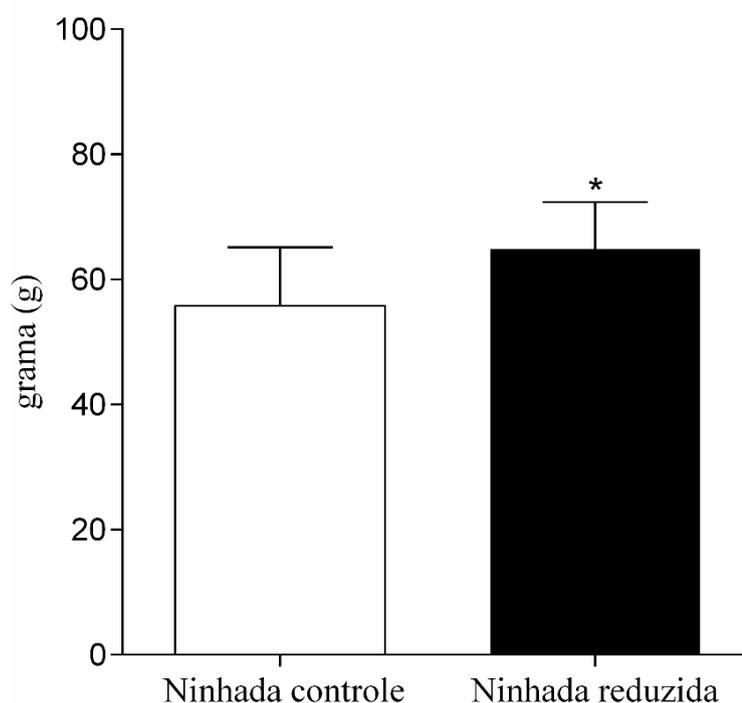
As análises estatísticas foram realizadas no *GraphPad Prism software* (versão 6.0) (GraphPad Software Inc., Irvine, CA). O teste de normalidade realizado foi o *Kolmogorov-Sminorf Test*. Os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada foram analisados pelo teste de *Mann Whitney* (não paramétricos). Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados pela ANOVA *two-way*, seguidos do pós-teste de *Bonferroni*. Os resultados estão representados como média \pm desvio padrão (SD) (dados paramétricos) ou mediana e intervalo interquartil (IQR) (dados não paramétricos). Foi considerado estatisticamente significativo p-valor $<0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA SOBRE A MASSA CORPORAL PÓS-DESMAME

A Figura 3 representa o efeito da redução das ninhadas, que consiste na retirada da competição entre os filhotes pela lactação como descrito anteriormente na metodologia.

Figura 3 - Efeito da redução da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame.



A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a Ninhada controle tinha 8 filhotes/mãe e a Ninhada reduzida tinha 4 filhotes/mãe ^(20,21). O efeito da manipulação do tamanho da ninhada foi analisado pelo teste de *Many Whitney*. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria

A proposta inicial do trabalho e a nossa primeira variável, foi estabelecer o modelo de ninhada reduzida, visto que a lactação é considerada uma janela de oportunidade para que ocorra uma programação metabólica, podendo acarretar alterações metabólicas futuras, sendo assim é de suma importância a sua compreensão.

De acordo com os nossos resultados, demonstrados na Figura 3, a redução das ninhadas foi eficiente em induzir o ganho de peso, resultando no sobrepeso neonatal, elevando a massa corporal pós-desmame em ~7%.

Nesse contexto a lactação é considerada uma janela de oportunidade, pela qual podem ocorrer programações metabólicas devido ao estado nutricional materno levando a alterações no processo de manutenção do equilíbrio corporal ^(62,63), favorecendo o aparecimento de comorbidades na vida adulta, como obesidade e doenças relacionadas ⁽⁶³⁾. É importante salientar que a experiência nutricional precoce é um fator importante sobre o desenvolvimento da prole, visto que durante esse período os hormônios necessários para o crescimento dependem de fatores ambientais, podendo então levar ao aparecimento de doenças ao longo da vida ^(47,48).

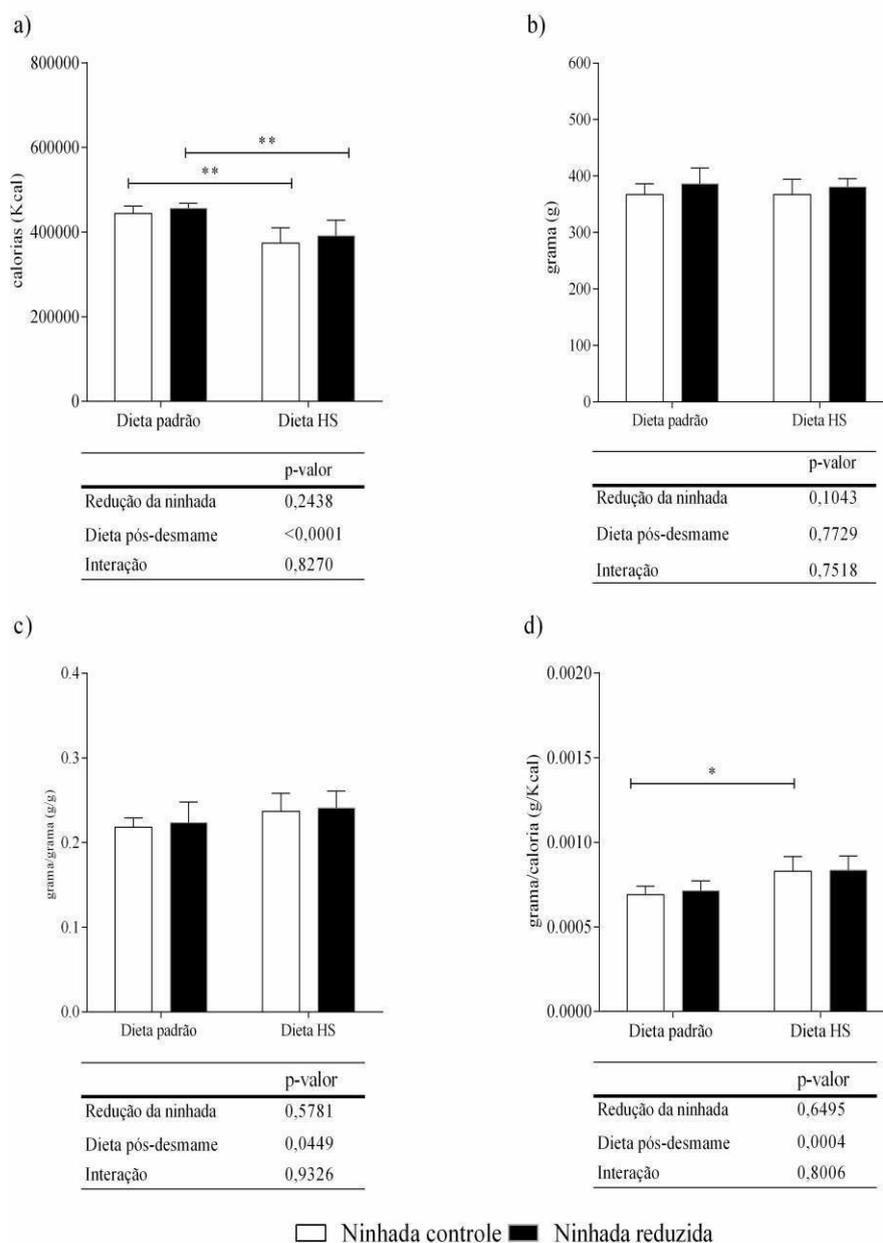
Sugere-se que a redução da ninhada seja fundamental no desenvolvimento do sistema nervoso central, que é responsável, dentre outras coisas, por regular o ganho de massa corporal ⁽²⁰⁾. A superlactação gerada pela redução da ninhada leva a um ganho de massa corporal maior durante a lactação, levando ao sobrepeso neonatal ⁽⁵⁸⁾, gerando, assim, uma relação inversamente proporcional, onde animais de ninhadas menores apresentam maior massa corporal pós-desmame.

Acredita-se que essa relação se deva ao maior consumo de leite pela prole, visto que a síntese de leite materno está aumentada devido ao número de filhotes nascidos ⁽⁶⁴⁾ e a maior ingestão alimentar que ocorre devido a imaturidade do mecanismo de controle da ingestão alimentar dos recém-nascidos ⁽⁶⁵⁾, resulta em um ganho de massa corporal maior que os animais da prole com menor disponibilidade de leite ⁽⁵⁸⁾.

5.2. EFEITOS DA REDUÇÃO DA NINHADA E DA DIETA HS SOBRE O COEFICIENTE DE EFICIÊNCIA ALIMENTAR (CEA) E SOBRE O COEFICIENTE DE GANHO DE PESO POR CONSUMO CALÓRICO (CGPCC) APÓS 8 SEMANAS

A Figura 4 representa os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre a ingestão calórica total, massa corporal final e eficiência alimentar, analisada a partir do coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC) dos animais após 8 semanas.

Figura 4 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre a ingestão calórica, sobre o ganho de massa corporal e sobre a eficiência alimentar após 8 semanas.



a) Ingestão calórica total de dieta HS de ratos Wistar (n=23) calculada a partir da multiplicação da ingestão alimentar (g) e do teor calórico da dieta (Kcal), determinada pela análise bromatológica (dados prévios do grupo); b) Ganho de massa corporal total de ratos Wistar (n=23); c) Coeficiente de eficiência alimentar de ratos Wistar (n=23) após 8 semanas de consumo de dieta rica em carboidratos simples, obtido pela subtração da massa corporal final e massa corporal pós desmame e dividido pela ingestão alimentar total; d) Coeficiente de ganho de peso por consumo calórico de ratos Wistar (n=23) após 8 semanas de consumo de dieta rica em carboidrato simples, obtido pela subtração da massa corporal final dos animais da massa corporal inicial dividido pela ingestão calórica. A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a Ninhada controle tinha 8 filhotes/ mãe e a Ninhada reduzida tinha 4filhotes/ mãe ^(20,21). Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados por ANOVA two-way,

seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$,

** $p < 0,01$. HS, dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: Elaboração própria

A partir desse tópico, inserimos a segunda variável do nosso estudo, ofertamos após o desmame dos animais uma dieta rica em carboidratos simples (dieta HS), marcando assim um período de transição de dietas, sendo assim considerada uma janela de oportunidade. Dessa forma, esperamos que a dieta seja capaz de induzir alterações metabólicas e gerar programações no metabolismo dos animais.

Com base na análise dos resultados, observamos que a ingestão calórica total foi influenciada pela dieta ($p < 0,001$), sendo a ingestão $\sim 19\%$ menor no grupo HS-NC e $\sim 17\%$ menor no grupo HS-NR quando comparados aos seus respectivos controles (Figura 4a). Mesmo com uma ingestão calórica diminuída, ao final do experimento, os animais possuíam massa corporal semelhantes (Figura 4b).

Segundo os resultados da eficiência alimentar, verificamos que o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) foi influenciado pela dieta pós-desmame ($p < 0,05$) (Figura 4c). Da mesma forma, o coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC) foi influenciado pela dieta ($p < 0,001$) aumentando em 20% no grupo HS-NC quando comparado ao grupo STD-NC (Figura 4d).

Tendo em vista os resultados de ganho de massa corporal e ingestão calórica dos animais é possível inferir que a dieta HS interfere na homeostase energética. Resultados similares indicam que a composição da dieta é capaz de alterar a saciedade, através da alteração da via de oxidação do carboidrato, na tentativa de manter a homeostase corporal⁽⁶⁶⁾. Sugere-se que a ingestão de dieta com alto teor de carboidrato após uma semana, levaria a uma diminuição da oxidação do carboidrato⁽⁶⁷⁾. Isso parece ocorrer por uma alteração na sinalização que ocorre no hipotálamo e regula a saciedade. Essa regulação leva a uma alteração no ciclo circadiano em resposta a alterações no padrão alimentar⁽⁶⁸⁾.

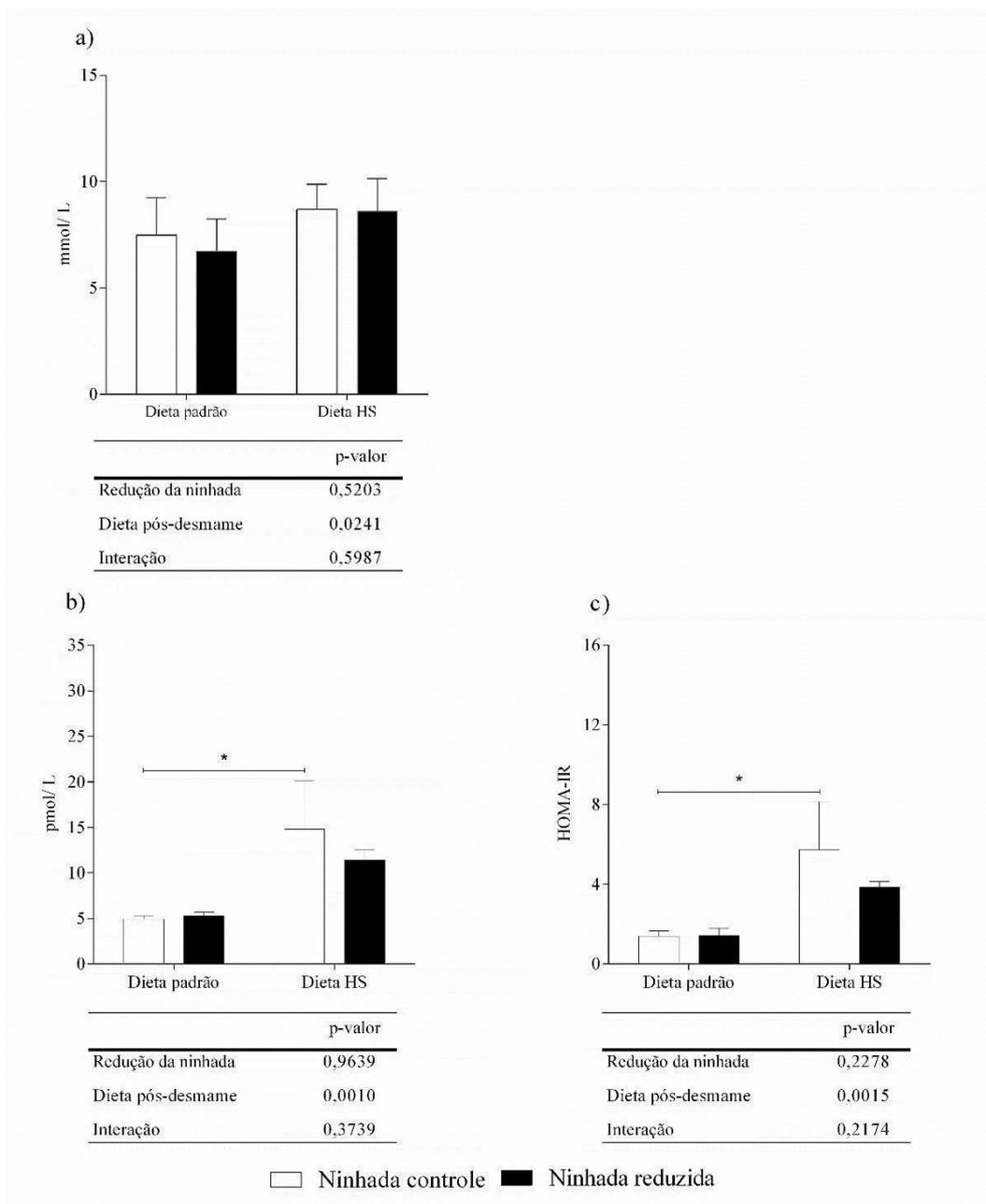
A massa corporal dos animais após as 8 semanas de experimento foi semelhante entre os grupos experimentais, indicando uma menor velocidade de ganho de peso após o desmame. Esse dado é corroborado pela literatura em estudos com metodologia similar de ninhada reduzida e dieta pós-desmame, os animais mesmo apresentando maior massa corporal pós-desmame, ao decorrer das semanas, entre 30 e 60 dias de experimento, equiparam o peso aos animais da ninhada controle⁽⁵⁸⁾.

Seguindo para os próximos resultados, o coeficiente de eficiência alimentar foi capaz de demonstrar a eficiência do animal metabolizar o alimento e o coeficiente de ganho de peso por consumo calórico, que demonstra a capacidade do animal ganharpeso quando submetido a uma determinada dieta podendo causar alterações metabólicas⁽⁵⁸⁾, verificamos que os animais de ambas ninhadas (reduzida e controle), metabolizam o carboidrato de forma diferente, o que induziu uma modificação na composição corporal desses animais, sem alterar a massa corporal^(58,69,70). A modificação na composição corporal, é devido a uma maior eficiência dos animais em converter o excedente de carboidrato vindos da dieta e estocar como fonte energética, favorecendo o aumento da adiposidade corporal⁽⁷¹⁾. Tais achados serão mais bem discutidos em outro tópico do trabalho.

5.3. EFEITOS DO TAMANHO DA NINHADA E DA DIETA HS SOBRE OS PARÂMETROS GLICOMETABÓLICOS APÓS 8 SEMANAS

A Figura 5 representa os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HS sobre os parâmetros glicometabólicos (glicose sérica, insulina e índice HOMA-IR) após 8 semanas.

Figura 5 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre os parâmetros glicometabólicos após 8 semanas.



a) Glicemia b) Insulinemia c) Índice HOMA. A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a Ninhada controle tinha 8 filhotes/ mãe e a Ninhada reduzida tinha 4 filhotes/ mãe (20,21). Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$. HS, dieta rica em carboidratos simples.

Fonte: Elaboração própria

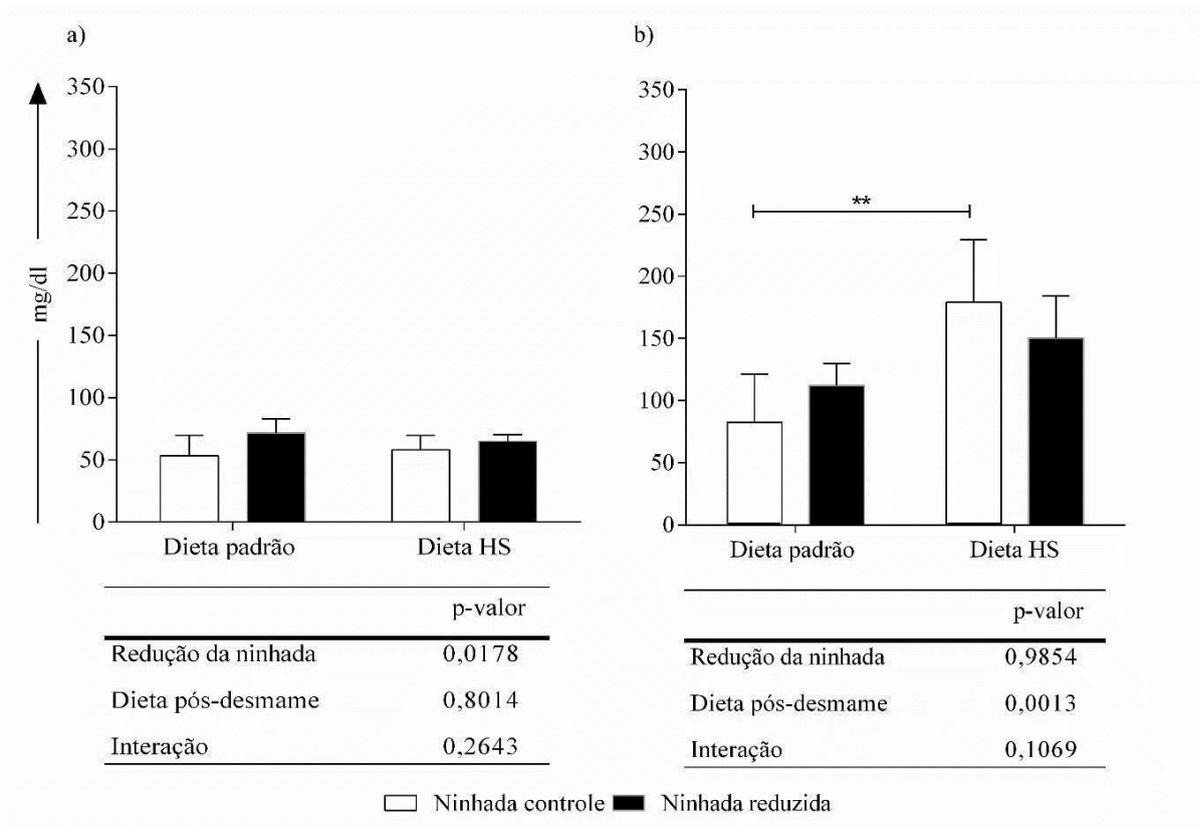
A partir desses resultados podemos observar que a dieta HS influenciou a glicemia ($p < 0,05$), entretanto o pós-teste não mostrou diferenças (Figura 5a). Em relação aos níveis de insulina, observamos que a dieta HS alterou a insulinemia (Figura 5b), aumentando em ~201% no grupo HS-NC quando comparado ao seu respectivo controle. Da mesma forma, a dieta altera o índice HOMA (Figura 5c) ($p < 0,05$), aumentando em ~313% no grupo HS-NC em relação ao controle STD-NC. Dessa forma, podemos sugerir que a dieta HS estabeleceu um quadro de RI nos animais da ninhada controle.

O presente estudo corrobora com os dados encontrados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, demonstrando que a dieta HS é eficiente em aumentar a massa adiposa levando ao desenvolvimento secundário da resistência à insulina (RI) e disfunção metabólica após as 8 semanas⁽¹⁷⁾. Tais achados vão de encontro com outros estudos encontrados na literatura que demonstram que animais submetidos a dietas com excesso de nutrientes, desenvolvem hiperinsulinemia, RI e aumento na adiposidade corporal^(10,72). Os achados serão mais bem discutidos nos próximos tópicos do trabalho.

5.4. EFEITOS DA MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA E DO CONSUMO DA DIETA HS SOBRE PERFIL LIPÍDICO SÉRICO APÓS 8 SEMANAS

A Figura 6 representa o efeito da redução da ninhada e do consumo da dieta HS sobre o perfil lipídico sérico (colesterol total e TAG) após 8 semanas.

Figura 6 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre o perfil lipídico sérico após 8 semanas.



a) Colesterol total b) TAG. A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a Ninhada controle tinha 8 filhotes/ mãe e a Ninhada reduzida tinha 4filhotes/ mãe^(20,21). Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. ** $p < 0,01$. HS, dieta rica em carboidratos simples; TAG, triacilglicerol.

Fonte: Elaboração própria.

As concentrações de colesterol total foram influenciadas pelo tamanho da ninhada, apesar do pós-teste não ter apresentado diferenças (Figura 6a). Além disso, o presente estudo demonstrou que as concentrações de TAG ($p < 0,05$) foram influenciadas pela dieta pós desmame, aumentando ~117% as concentrações séricas de TAG no grupo HS-NC em relação ao seu respectivo controle (Figura 6b).

A alteração no colesterol total, ainda precisa ser melhor elucidada com novos experimentos, visto que as dosagens realizadas analisaram apenas o colesterol total, dessa forma, a dosagem das frações do colesterol (HDL e LDL) se faz necessária para determinar o motivo real para a alteração do mesmo. Entretanto, nosso grupo pautado

na literatura, traçou algumas hipóteses que podem justificar o motivo do aumento do colesterol.

A literatura vem relatando que as concentrações de colesterol no plasma se desenvolvem de maneira diferente dependendo do tamanho da ninhada, demonstrando que animais de ninhadas reduzidas apresentam aumento no colesterol plasmático⁽⁷³⁾. Além disso, as concentrações de colesterol no adulto dependem da quantidade de colesterol recebida pelo animal na fase de lactação⁽⁷⁴⁾. As concentrações de colesterol total diminuíram em animais alimentados com dieta HS⁽⁷²⁾. Outro fator a ser considerado é que a lactação diminuiria a síntese de colesterol, pois a composição do leite, com altas concentrações de colesterol, levariam a uma regulação negativa da enzima hidroximetilglutaril-CoA⁽⁷⁵⁾.

Os resultados seguintes sugerem que o carboidrato da dieta está sendo desviado para a síntese de TAG, demonstrando assim que os animais receberam um aporte calórico maior que o necessário. Sabe-se que o carboidrato vindo da dieta é a principal fonte de energia do corpo, sendo sua principal via de utilização a via glicolítica⁽⁷⁶⁾. Quando o consumo de carboidrato é superior as necessidades energéticas, gera um balanço energético positivo, o carboidrato excedente é desviado para a síntese de ácidos graxos, gerando uma hipertrigliceridemia^(34,77).

Com a grande disponibilidade de glicose na corrente sanguínea e alta liberação de insulina pelas células beta pancreáticas, há uma alta produção de ATP e citrato, que são responsáveis por inibir a via glicolítica e aumentar o funcionamento da via lipolítica no fígado. O citrato excedente produzido pelo ciclo do ácido cítrico, é conjugado com uma molécula de malonil-CoA e após 6 reações cíclicas formam o palmitato, esse por sua vez é responsável pela formação dos ácidos graxos de cadeia longa⁽³⁴⁾.

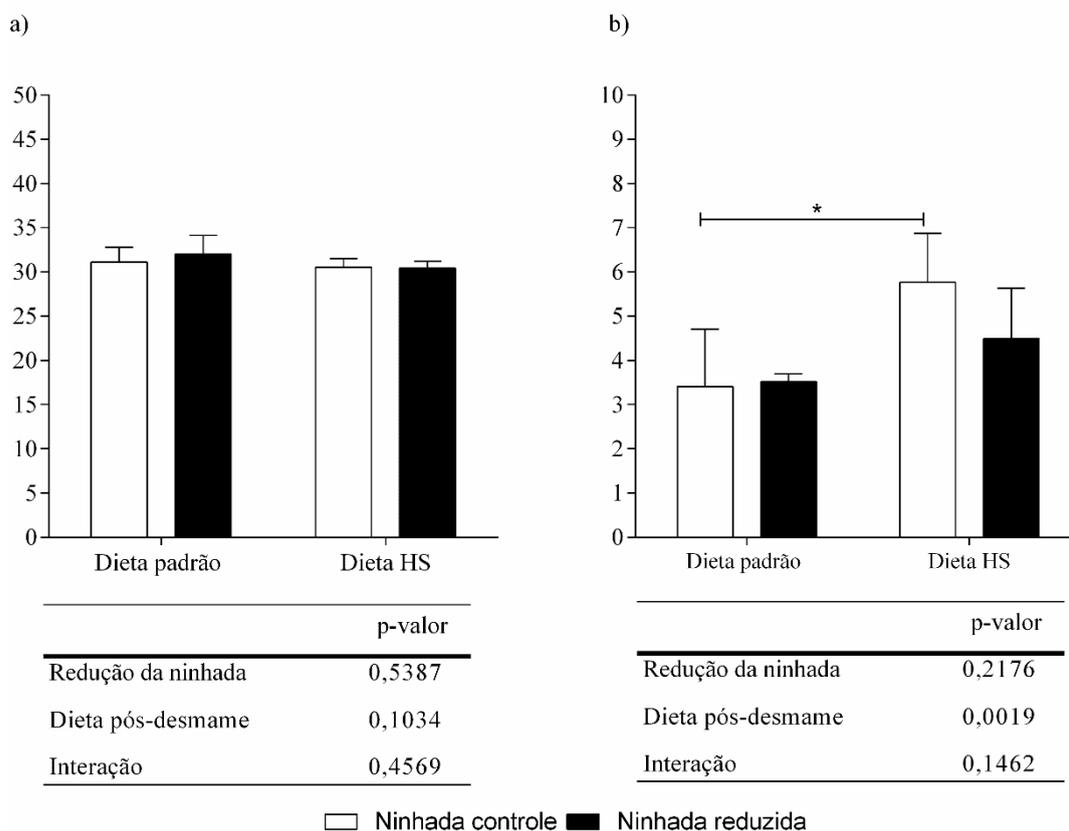
A partir do aumento da síntese de ácidos graxos e ainda na presença da insulina, o mesmo é esterificado com o glicerol (3 moléculas de ácidos graxos e 1 molécula de glicerol), para a formação de uma molécula de TAG. O TAG é conjugado a uma lipoproteína (VLDL) ativado pela apoproteína CII, para ser transportados pelos capilares e posteriormente armazenado no TAB⁽⁷⁷⁾. O consumo de carboidrato simples leva então a hipertrofia da célula, que quando atinge sua capacidade máxima de armazenamento de TAG, sofre hipóxia. Com isso a célula é destruída (lise celular), liberando ácidos graxos na corrente sanguínea⁽³⁴⁾.

Dessa forma, é possível afirmar que a hipertrigliceridemia está relacionada ao alto consumo de carboidratos ofertados pela dieta HS, levando a um aumento na lipogênese hepática e resultando em altas concentrações séricas de TAG^(10,78).

5.5. EFEITOS DO TAMANHO DA NINHADA E DA DIETA HS SOBRE OS PARÂMETROS BIOMÉTRICOS APÓS 8 SEMANAS

A Figura 7 descreve os efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre os parâmetros biométricos (índices de Lee e de adiposidade) após 8 semanas.

Figura 7 –Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre os parâmetros biométricos após 8 semanas.



a) Índice de Lee (IL), foi obtido a partir da raiz cúbica do peso corporal dividido pelo comprimento naso-anal. b) Índice de adiposidade (IA), foi obtido a partir da soma do peso dos tecidos adiposos dividido pela massa corporal. A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a ninhada controle tinha 8 filhotes/ mãe e a Ninhada reduzida tinha 4 filhotes/ mãe^(20,21). Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$. HS, dieta rica em carboidratos simples. Fonte: Elaboração própria.

Como descrito previamente na metodologia do presente trabalho, ao final das 8 semanas de experimento os animais foram pesados, tiveram o comprimento naso-anal mensurado e prosseguiu-se com a eutanásia. Após a eutanásia, foram dissecados o TAB (inguinal, retroperitoneal e epididimal) e o tecido adiposo marrom. Para realizar o

cálculo do IL foi utilizado a massa corporal e o comprimento naso-anal dos animais e para realizar o cálculo do IA foi utilizado a massa corporal e o peso dos coxins adiposos dos animais.

Não observamos alterações no IL durante as 8 semanas do experimento (Figura 7a). Entretanto, a composição corporal dos animais foi influenciada pela dieta ($p < 0,05$), aumentando em ~69% o IA no grupo HS-NC, em relação ao seu respectivo controle (Figura 7b).

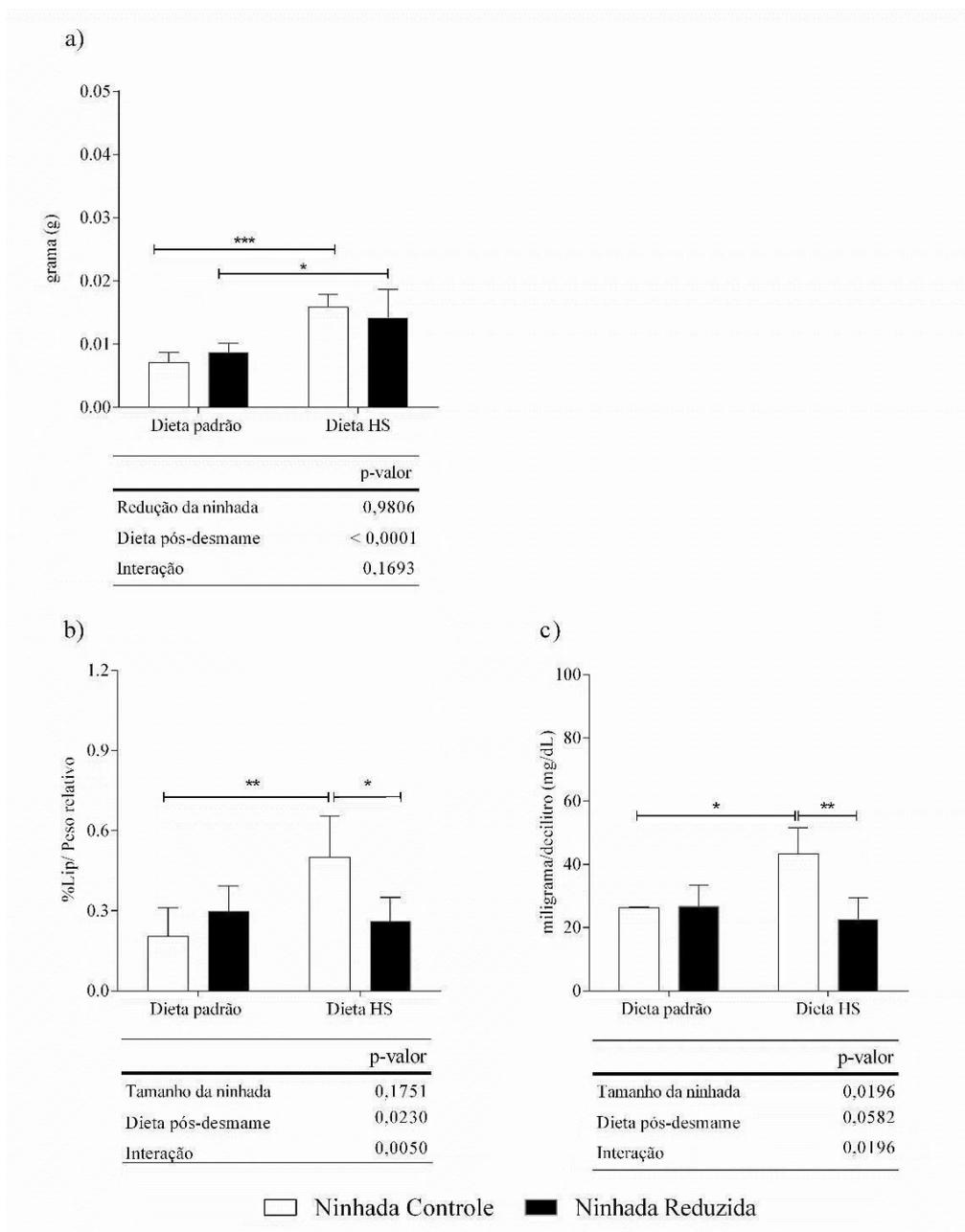
Os dados encontrados nesse estudo corroboram com os dados publicados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa, onde o índice de Lee não sofre alterações em 8 semanas⁽⁷⁹⁾.

A adiposidade corporal está aumentada no grupo HS-NC quando comparado ao respectivo controle, demonstrando assim uma composição corporal diferente entre os grupos, mesmo sem alterações significativas na massa corporal dos mesmos⁽³⁷⁾. Resultados anteriores do nosso grupo, mostram que o consumo de carboidratos simples favorece a maior adiposidade corporal, sem no entanto modificar a massa corporal⁽⁷⁹⁾. Confirmando que o consumo excessivo de dietas ricas em carboidratos modula as vias celulares que controlam a lipogênese⁽¹⁰⁾. Isso ocorre, devido à grande disponibilidade de glicose, que será usada nesse momento em vias metabólicas de síntese de ácidos graxos. É possível sugerir que o aumento da massa adiposa seja decorrente de uma hipertrofia das células do tecido adiposo visceral. A hipertrofia, por sua vez leva a disfunção das células beta pancreáticas, devido a uma lipotoxicidade⁽⁸⁰⁾. A maior concentração de ácidos graxos livres no plasma, glicerol e no citocinas inflamatórias causam uma falha na translocação no GLUT4 para a membrana, reduzindo a captação de glicose e diminuindo a sensibilidade a insulina, favorecendo uma RI^(33,36) e maior adiposidade corporal⁽¹⁰⁾. Estes dados serão corroborados pelos resultados que apresentaremos a seguir.

5.6. EFEITOS DA MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA E DO CONSUMO DA DIETA HS SOBRE O PESO RELATIVO E O PERCENTUAL DE LIPÍDEOS NO TAR

A Figura 8 demonstra o efeito da redução da ninhada e da dieta HS sobre o peso relativo e o percentual de lipídeos do TAR.

Figura 8 - Efeitos da redução da ninhada e da dieta HS sobre o peso relativo e o percentual de lipídeos do TAR após 8 semanas.



a) Peso relativo do TAR, obtido pela divisão do peso do TAR pela massa corporal do animal; b) Percentual de lipídeos do TAR, obtido através do produto do peso relativo do TAR pela quantidade de lipídeo na amostra; c) Dosagem de TAG do TAR. A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a NC tinha 8 filhotes/ mãe e a NR tinha 4 filhotes/ mãe^(20,21). Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta foram analisados por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni. Os dados estão representados em média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. HS, dieta rica em carboidratos simples; TAR, tecido adiposo retroperitoneal; TAG, triacilglicerol.

Fonte: Elaboração própria.

O presente estudo demonstrou que, apesar da massa corporal não se alterar, a composição corporal dos animais foi diferente, visto que a dieta influenciou o peso relativo do TAR ($p < 0,001$), aumentado ~123% no grupo HS-NC e 63% no grupo HS-NR quando comparados aos respectivos controles (Figura 8a). O percentual de lipídeos também foi influenciado pela dieta ($p < 0,05$), aumentando de ~115% no grupo HS-NC (Figura 8b). Também foi observado que a dieta pós desmame influenciou o teor de TAG no TAR, aumentando em ~64% no grupo HS-NC (Figura 8c).

Por sua vez a redução da ninhada parece conter os efeitos da dieta rica em carboidrato simples no TAR, visto que a interação entre as duas variáveis altera o percentual de lipídeos no TAR ($p < 0,05$), reduzindo em ~23% o valor no grupo HS-NR, quando comparado ao HS-NC (Figura 8b). Ainda, a interação foi responsável por induzir uma redução de ~43,5% de TAG no TAR no grupo HS-NR quando comparado ao HS-NC (Figura 8c).

O presente estudo demonstra que a dieta rica em carboidratos simples altera as vias metabólicas, causando um maior estímulo lipogênico. Esse aumento da lipogênese se deve a maior deposição de lipídeos no TAR, principalmente na forma de TAG, sugerindo uma hipertrofia do adipócito. Dados anteriores do nosso grupo corroboram com esse resultado, mostrando que o estímulo lipogênico induzido pelo consumo da dieta HS por 8 semanas leva a um aumento do TAR, induzindo uma hipertrofia da célula adiposa, devido ao maior aporte calórico e consequente deposição de lipídeos no TAR⁽¹⁷⁾. Existem evidências também que mostram que o acúmulo de gordura visceral, pode levar a alterações metabólicas e fisiopatológicas, contribuindo para o estabelecimento do quadro de RI⁽⁸¹⁾. Dessa forma, podemos sugerir que a dieta HS culminou em RI devido a hipertrofia do adipócito. Entretanto, novos experimentos seriam necessários para a confirmação da nossa hipótese. O TA é um importante órgão endócrino regulador de diversas adipocitocinas. A expressão de adipocitocinas, como TNF-alfa, IL-6 e resistina, são comuns nas células hipertróficas e podem conferir alguns efeitos deletérios ao organismo, estando intimamente relacionadas a RI e aumento da adiposidade corporal⁽⁸²⁾.

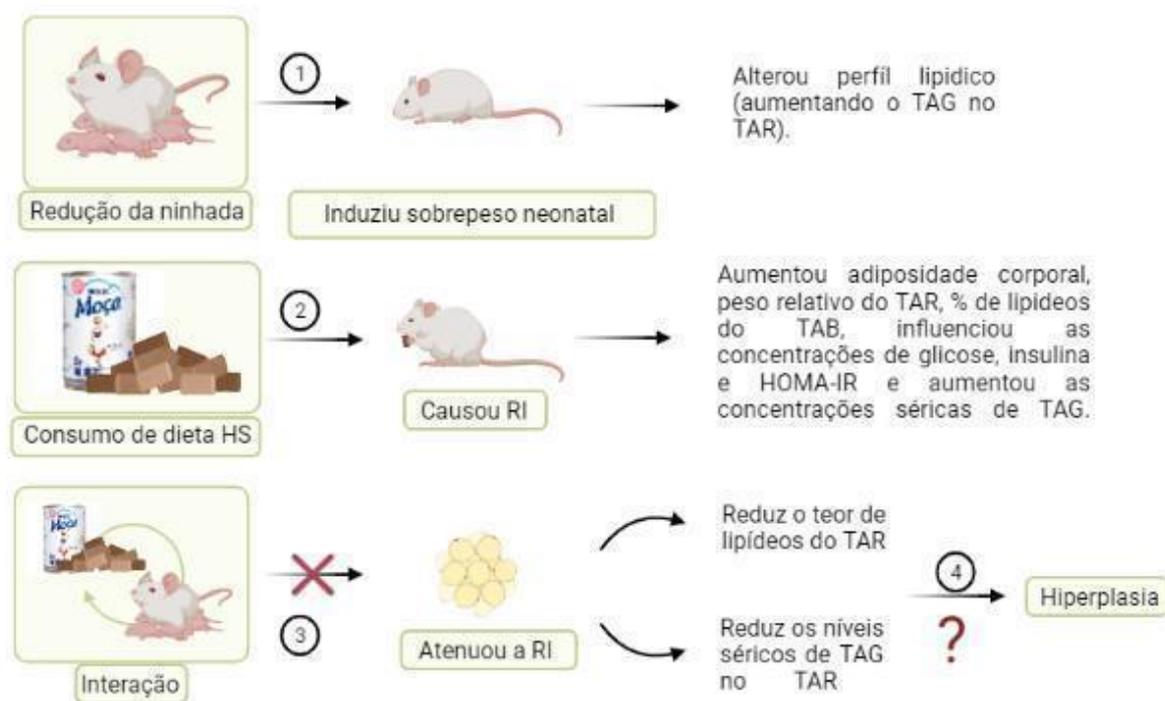
Por outro lado, os resultados apresentados decorrentes da interação sugerem uma hiperplasia do TA, uma vez que, apesar do aumento do TAR, tanto o percentual de lipídeos quanto o teor de TAG do tecido estavam diminuídos. Essa hipótese é bastante atrativa, uma vez que a literatura relata que a hiperplasia do adipócito exerce efeitos benéficos ao organismo, levando a expressão de adipocitocinas como adiponectina e

leptina, que controlariam o balanço energético e promoveriam uma melhoria da sinalização da insulina, atenuando a RI⁽⁸²⁾. Segundo um estudo realizado por Horta e cols.⁽⁸³⁾, a lactação parece conter o desenvolvimento do TA⁽⁸³⁾, pois esta fase é considerada propícia para estimular a adipogênese, resultando em hiperplasia dos adipócitos^(72,84) e, conseqüentemente, resultando em respostas metabólicas que melhorariam a RI⁽⁸²⁾. Entretanto, para compreender melhor o mecanismo, novos experimentos seriam necessários para estabelecer o fenômeno biológico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os principais resultados do trabalho estão expressos resumidamente na Figura 9.

Figura 9 - Efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da dieta rica em carboidrato



simples sobre o grau de adiposidade e metabolismo de ratos jovens.

A redução da ninhada (1) induziu o sobrepeso neonatal e alterou o perfil lipídico dos animais, aumentando o TAG no TAR; o consumo de dieta HS (2) causou RI, aumentou a adiposidade corporal, o peso relativo do TAR e o teor de lipídeos, além de alterar os parâmetros glicometabólicos; a interação (3) entre redução da ninhada e dieta HS atenuou a RI, reduziu o teor de lipídeos e os níveis séricos de TAG no TAR. Nossos resultados sugerem que a interação entre as variáveis (4) levaria a uma hiperplasia do TAR, culminando na melhora das respostas metabólicas observadas. Entretanto, novos experimentos são necessários para confirmar a nossa hipótese. A redução da ninhada foi feita como previamente publicado, na qual a NC tinha 8 filhotes/ mãe e a NR tinha 4 filhotes/ mãe^(20,21). Os efeitos do tamanho da ninhada e

da dieta foram analisados por ANOVA two-way, seguido do pós-teste de Bonferroni. HS, dieta rica em carboidratos simples; TAG, triacilglicerol; TAR, tecido adiposo retroperitoneal; RI, resistência à insulina. Fonte: Elaboração própria, Bio Render, 2021. Disponível em <https://app.biorender.com/gallery/illustrations>. Acesso em 15 de junho de 2021.

- Em suma, nossos principais resultados foram: A redução da ninhada foi capaz de induzir o sobrepeso neonatal e influenciou a concentração sérica de colesterol total dos animais e de TAG no TAR após 8 semanas;
- O consumo da dieta HS após 8 semanas foi capaz de aumentar a adiposidade corporal, aumentando o peso relativo do TAR, o seu teor de lipídeos e TAG, e causou RI, pois influenciou as concentrações de glicose, insulina e o HOMA-IR, além de elevar as concentrações séricas de TAG;
- A interação entre as variáveis (tamanho da ninhada e dieta pós-desmame) reduziu o percentual de lipídeos e os níveis de TAG no TAR, além de impedir o desenvolvimento da RI observada no grupo que recebeu a dieta HS.

Diante do exposto, os resultados obtidos até o momento sugerem que a interação entre a redução da ninhada e dieta HS exerce um efeito protetor no desenvolvimento da RI e do TAR, possivelmente decorrente da estimulação de uma hiperplasia em detrimento da hipertrofia. Entretanto, futuros experimentos são necessários para compreender o mecanismo por trás deste evento biológico.

7. REFERÊNCIAS

1. Rodrigues AL, De Moura EG, Fonseca Passos MC, et al. Postnatal early overnutrition changes the leptin signalling pathway in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of young and adult rats. *J Physiol* 2009; 587: 2647–2661.
2. Waterland RA, Garza C. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 179–197.
3. Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 2012; 94: 2242–2263.
4. Ferretti S, Fornari A, Pedrazzi P, et al. Developmental overfeeding alters hypothalamic neuropeptide mRNA levels and response to a high-fat diet in adult mice. *Peptides* 2011; 32: 1371–1383.
5. Janovska P, Kopecky J. Adipose tissue-muscle interactions and the metabolic effects of n-3 LCPUFA - implications for programming effects of early diet. *Adv Exp Med Biol* 2009; 646: 149–157.
6. Conceição EPS, Franco JG, Oliveira E, et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition - role of insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2013; 24: 81–87.
7. Stephen A, Alles M, De Graaf C, et al. The role and requirements of digestible dietary carbohydrates in infants and toddlers. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66: 765–779.
8. OMS/OPS. Panorama de la Seguridad Alimentaria y Nutricional en América Latina y el Caribe *Organ las Nac Unidas para la Aliment y la Agric.*
9. White PAS, Cercato LM, Araújo JMD, et al. Modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica e associada à resistência à ação da insulina e intolerância à glicose. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2013; 57: 339–345.
10. Shankar K, Harrell A, Kang P, et al. Carbohydrate-responsive gene expression in the adipose tissue of rats. *Endocrinology* 2010; 151: 153–164.
11. Santista CB, Botucatu R. Oller donascimento dieta rica lipidios Oller.pdf. 2009; 81: 453–466.

12. Freitas MC, Ceschini FL, Ramallo BT. Resistência à Insulina Associada à Obesidade: Efeitos Anti-Inflamatórios do Exercício Físico. *Rev Bras Ciência e Mov* 2014; 22: 139–147.
13. Horta BL, Loret De Mola C, Victora CG. Long-term consequences of breastfeeding on cholesterol, obesity, systolic blood pressure and type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2015; 104: 30–37.
14. Portella AK, Silveira PP, Laureano DP, et al. Litter size reduction alters insulin signaling in the ventral tegmental area and influences dopamine-related behaviors in adult rats. *Behavioural Brain Research* 2015; 278: 66–73.
15. Bei F, Jia J, Jia YQ, et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis* 2015; 14: 1–12.
16. Joslowski G, Goletzke J, Cheng G, et al. Prospective associations of dietary insulin demand, glycemic index, and glycemic load during puberty with body composition in young adulthood. *Int J Obes* 2012; 36: 1463–1471.
17. de Queiroz KB, Coimbra RS, Ferreira AR, et al. Molecular mechanism driving retroperitoneal adipocyte hypertrophy and hyperplasia in response to a high-sugar diet. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58: 2331–2341.
18. Jo J, Gavrilova O, Pack S, et al. Hypertrophy and/or hyperplasia: Dynamics of adipose tissue growth. *PLoS Comput Biol*; 5. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000324.
19. Venereol ID, Pigmentosum X. in C Er C Er. 2012; 147: 135–140.
20. Clarke MA, Stefanidis A, Spencer SJ. Postnatal overfeeding leads to obesity and exacerbated febrile responses to lipopolysaccharide throughout life. *J Neuroendocrinol* 2012; 24: 511–524.
21. Stefanidis A, Spencer SJ. Effects of Neonatal Overfeeding on Juvenile and Adult Feeding and Energy Expenditure in the Rat. *PLoS One*; 7. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0052130.
22. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The Mammalian Epigenome. *Cell* 2007;

- 128: 669–681.
23. Sullivan EL, Smith MS, Grove KL. Perinatal exposure to high-fat diet programs energy balance, metabolism and behavior in adulthood. *Neuroendocrinology* 2011; 93: 1–8.
 24. Fernandez-Twinn DS, Ozanne SE. Early life nutrition and metabolic programming. *Ann N Y Acad Sci* 2010; 1212: 78–96.
 25. Xavier JLP, Scomparin DX, Pontes CC, et al. Litter size reduction induces metabolic and histological adjustments in dams throughout lactation with early effects on offspring. *An Acad Bras Cienc* 2019; 91: 1–17.
 26. Bentham J, Di Cesare M, Bilano V, et al. Worldwide trends in body-mass index, underweight, overweight, and obesity from 1975 to 2016: a pooled analysis of 2416 population-based measurement studies in 128.9 million children, adolescents, and adults. *Lancet* 2017; 390: 2627–2642.
 27. Hanley B, Dijane J, Fewtrell M, et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities. *Br J Nutr* 2010; 104: S1–S25.
 28. Fromme T, Klingenspor M. Uncoupling protein 1 expression and high-fat diets. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol*; 300. Epub ahead of print 2011. DOI: 10.1152/ajpregu.00411.2010.
 29. Arai C, Arai N, Mizote A, et al. Trehalose prevents adipocyte hypertrophy and mitigates insulin resistance. *Nutr Res* 2010; 30: 840–848.
 30. Manuscript A. *Diabetes*. 2014; 24: 436–442.
 31. Asghar A, Sheikh N. Role of immune cells in obesity induced low grade inflammation and insulin resistance. *Cell Immunol* 2017; 315: 18–26.
 32. Barbosa de Queiroz K, Honorato-Sampaio K, Victor Rossoni Jú nior J, et al. Physical activity prevents alterations in mitochondrial ultrastructure and glucometabolic parameters in a high-sugar diet model OPEN ACCESS. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0172103.
 33. Fonseca-Alaniz M, Takada J, Alonso-Vale MIC, et al. Tecido Adiposo e

- Regulação Metabólica. *Arq Bras Endocrinol e Metab* 2006; 50: 216–29.
34. LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX M. M. *Princípios de Bioquímica. 6ª Edição.* 6ª edição. 2014.
 35. de Lima DC, Silveira SA, Haibara AS, et al. The enhanced hyperglycemic response to hemorrhage hypotension in obese rats is related to an impaired baroreflex. *Metab Brain Dis* 2008; 23: 361–373.
 36. Longo M, Zatterale F, Naderi J, et al. Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International Journal of Molecular Sciences*; 20. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3390/ijms20092358.
 37. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007; 41: 111–119.
 38. Pereira PF, Cássia R De, Alfenas G, et al. Aleitamento Materno Influencia Dm. *J Pediatr (Rio J)* 2014; 90: 7–15.
 39. Gomes RM, Bueno FG, Schamber CR, et al. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2018; 61: 24–32.
 40. Kaung HC. Growth dynamics of pancreatic islet cell populations during fetal and neonatal development of the rat. *Dev Dyn* 1994; 200: 163–175.
 41. Habbout A, Li N, Rochette L. Superalimentação pós-natal em roedores pela redução do tamanho da ninhada induz consequências fisiopatológicas importantes de curto e longo prazo 1 , 2. 2013; 553–562.
 42. Grove KL, Grayson BE, Glavas MM, et al. Development of metabolic systems. In: *Physiology and Behavior*. Elsevier Inc., 2005, p. 646–660.
 43. Arora S, Anubhuti. Role of neuropeptides in appetite regulation and obesity - A review. *Neuropeptides* 2006; 40: 375–401.
 44. Morris MJ, Chen H. Established maternal obesity in the rat reprograms hypothalamic appetite regulators and leptin signaling at birth. *Int J Obes* 2009; 33: 115–122.
 45. Prior LJ, Armitage JA. Neonatal overfeeding leads to developmental

- programming of adult obesity: You are what you ate. *J Physiol* 2009; 587: 2419.
46. Bouret SG. Role of early hormonal and nutritional experiences in shaping feeding behavior and hypothalamic development. *J Nutr* 2010; 140: 653–657.
 47. Plagemann A, Harder T, Franke K, et al. Long-term impact of neonatal breast-feeding on body weight and glucose tolerance in children of diabetic mothers. *Diabetes Care* 2002; 25: 16–22.
 48. Habbout A, Li N, Rochette L, et al. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. *J Nutr* 2013; 143: 553–562.
 49. Grunewald M, Hellmuth C, Demmelmair H, et al. Excessive weight gain during full breast-feeding. *Ann Nutr Metab* 2014; 64: 271–275.
 50. Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 1996; 34: 389–398.
 51. Thompson N, Huber K, Bedürftig M, et al. Metabolic programming of adipose tissue structure and function in male rat offspring by prenatal undernutrition. *Nutr Metab* 2014; 11: 1–10.
 52. Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, et al. Adipose tissue remodeling: Its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2016; 7: 1–16.
 53. César Farias de Queiroz J, Isabel Cardoso Alonso-Vale M, Curi R, et al. Controle da adipogênese por ácidos graxos Control of adipogenesis by fatty acids. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2009; 53: 582–594.
 54. Cryer A, Jones HM. The Development of White Adipose Tissue. *Biochem J* 1980; 186: 805–815.
 55. Rinaldi W, Ribeiro TA da S, Marques AS, et al. Effect of small litter size on the autonomic and metabolic responses of wistar rats. *Rev Nutr* 2012; 25: 321–330.
 56. Bassett DR, Craig BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *J Appl Physiol* 1988; 64: 1249–1256.
 57. Stefanidis A, Spencer SJ. Effects of Neonatal Overfeeding on Juvenile and Adult

- Feeding and Energy Expenditure in the Rat. *PLoS One* 2012; 7: 52130.
58. Nery C da S, Pinheiro IL, Muniz G de S, et al. Medidas murinométricas e eficiência alimentar em ratos provenientes de ninhadas reduzidas na lactação e submetidos ou não ao exercício de natação. *Rev Bras Med do Esporte* 2011; 17: 49–55.
 59. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, et al. Homeostasis model assessment: insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* 1985; 28: 412–419.
 60. Lee MO. DETERMINATION OF THE SURFACE AREA OF THE WHITE RAT WITH ITS APPLICATION TO THE EXPRESSION OF METABOLIC RESULTS. *Am J Physiol Content* 1929; 89: 24–33.
 61. FOLCH J, LEES M, SLOANE STANLEY GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957; 226: 497–509.
 62. Jacobs S, Teixeira DS, Guilherme C, et al. The impact of maternal consumption of cafeteria diet on reproductive function in the offspring. *Physiol Behav* 2014; 129: 280–286.
 63. Srinivasan M, Katewa SD, Palaniyappan A, et al. Maternal high-fat diet consumption results in fetal malprogramming predisposing to the onset of metabolic syndrome-like phenotype in adulthood. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2006; 291: 792–799.
 64. Davidowa H, Plagemann A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. *Neuroreport* 2001; 12: 3201–3204.
 65. McMillen IC, Adam CL, Mühlhäusler BS. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *J Physiol* 2005; 565: 9–17.
 66. Hermana Miranda Hermsdorff H, Pinheiro Volp AC, Bressan J. O perfil de macronutrientes influencia a termogênese induzida pela dieta e a ingestão calórica. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2007; 57: 33–42.
 67. Hermana Miranda Hermsdorff H, Pinheiro Volp AC, Bressan J. O perfil de

- macronutrientes influencia a termogênese induzida pela dieta e a ingestão calórica. *Arch Latinoam Nutr* 2007; 57: 33–42.
68. Pickel L, Sung HK. Feeding Rhythms and the Circadian Regulation of Metabolism. *Frontiers in Nutrition*; 7. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3389/fnut.2020.00039.
 69. Neville MC, Anderson SM, McManaman JL, et al. Lactation and neonatal nutrition: Defining and refining the critical questions. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2012; 17: 167–188.
 70. Panchal SK, Poudyal H, Iyer A, et al. High-carbohydrate high-fat diet-induced metabolic syndrome and cardiovascular remodeling in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2011; 57: 51–64.
 71. Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, et al. Early Overnutrition Results in Early-Onset Arcuate Leptin Resistance and Increased Sensitivity to High-Fat Diet. *Endocrinology* 2010; 151: 1598–1610.
 72. Boqué N, Campión J, Paternain L, et al. Influence of dietary macronutrient composition on adiposity and cellularity of different fat depots in Wistar rats. *J Physiol Biochem* 2009; 65: 387–395.
 73. Kroeger S, Hahn P. Cholesterol synthesis in the small intestine and adipose tissue of suckling rats: The effect of litter size. *Biol Neonate* 1983; 44: 123–128.
 74. Hahn P, Walker BL. Hepatic 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase response to litter size in suckling rats. *Can J Biochem* 1979; 57: 1216–1219.
 75. Wong WW, Hachey DL, Insull W, et al. Effect of dietary cholesterol on cholesterol synthesis in breast-fed and formula-fed infants. *J Lipid Res* 1993; 34: 1403–1411.
 76. Fontan J dos S, Amadio MB. O uso do carboidrato antes da atividade física como recurso ergogênico: Revisão sistemática. *Rev Bras Med do Esporte* 2015; 21: 153–157.
 77. Leoni de Sousa R, Navarro F. Breve relato da diabetes tipo II e sua relação com o metabolismo de lipídeos, o exercício resistido e os efeitos deste: quebrando dogmas. *Revista Brasileira de Prescrição e Fisiologia do Exercício (RBPFE)*

- 2013; 7: 6.
78. Parks EJ. Changes in fat synthesis influenced by dietary macronutrient content. *Proc Nutr Soc* 2002; 61: 281–286.
 79. De Queiroz KB, Guimarães JB, Coimbra CC, et al. Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Lipids* 2014; 49: 85–96.
 80. Shankar K, Harrell A, Kang P, et al. Carbohydrate-responsive gene expression in the adipose tissue of rats. *Endocrinology* 2010; 151: 153–164.
 81. Weisberg SP, McCann D, Desai M, et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 2003; 112: 1796–1808.
 82. Guimarães DED, Sardinha FL de C, Mizurini D de M, et al. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Rev Nutr* 2007; 20: 549–559.
 83. Horta B, Bahl R, Martines J, et al. Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses. *World Heal Organ* 2007; 1–52.
 84. Arner E, Westermark PO, Spalding KL, et al. Adipocyte turnover: Relevance to human adipose tissue morphology. *Diabetes* 2010; 59: 105–109.

8. ANEXOS

ANEXO 1- CERTIFICADO DO COMITÊ DE NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos do sobrepeso neonatal induzido por aleitamento materno sobre a resistência à insulina em modelo experimental induzido por dieta rica em carboidratos simples (high sugar diet)", protocolada sob o CEUA nº 2245040518 (10 000070), sob a responsabilidade de **Karina Barbosa de Queiroz** e equipe; **Daniela Costa Caldeira** - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 13/07/2018.

We certify that the proposal "Effects of neonatal breast overfeeding on the insulin resistance in a high-sugar diet model.", utilizing 60 Heterogenics rats (60 males), protocol number CEUA 2245040518 (10 000070), under the responsibility of **Karina Barbosa de Queiroz** and team; **Daniela Costa Caldeira** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/13/2018.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 09/2018 a 12/2022 Área: Ciências Biológicas

Origem:	Centro de Ciência Animal	sexo:	Machos	idade:	21 a 28 dias	N:	60
Especie:	Ratos heterogênicos			Peso:	45 a 55 g		
Linhagem:	Wistar						

Local do experimento: Os experimentos de manipulação do tamanho das ninhadas serão realizados no CCA. Após os desmame, os animais serão levados para o Biotério de Nutrição experimental da Escola de Nutrição, onde será realizada a manutenção com dieta rica em carboidratos simples e, após as oito semanas de experimento, será realizada a eutanásia.

Ouro Preto, 23 de julho de 2018

Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto

ANEXO 2 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER NO CONGRESSO NACIONAL DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO, CONAN, 2019



IV CONAN
Congresso Nacional de
Alimentos e Nutrição

I CONGRESSO DE PÓS GRADUAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO
VII CONGRESSO MINEIRO DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO
I SIMPÓSIO DE GASTRONOMIA
I SIMPÓSIO NACIONAL DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

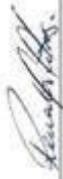
27 a 31 maio 2019
Alimentação, ciência,
cultura e inovação.

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado Efeitos do aleitamento em livre demanda (overfeeding neonatal) e da dieta rica em carboidratos simples sobre o grau de adiposidade e metabolismo de ratos jovens de autoria de Thais Araújo Barud, Isabela Jesus de Deus, Tatiane Maria dos Santos, Ângela Antunes Silva, Miliane Martins de Andrade Fagundes e KARINA BARBOSA DE QUEIROZ, foi apresentado no IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição e I Congresso de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição, realizado entre os dias 27 e 31 de maio de 2019.

Ouro Preto, 31 de maio de 2019.

Verifique o código de autenticidade 149643.8935044.827780.8.5875138196553044363 em
<https://www.event3.com.br/documents>



Prof. Dra. Renata Nascimento de Freitas
 Coordenadora do IV Congresso Nacional de Alimentos e Nutrição

Patrocínio:



Apóio:



Realização:



ANEXO 3 – CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE PÔSTER NO XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFOP - ENCONTRO DE SABERES (SEIC), 2019



 República Federativa do Brasil

 Ministério da Educação

Certificamos que THAIS ARAUJO BARUD participou do XXVII Seminário de Iniciação Científica da UFOP – ENCONTRO DE SABERES, realizado de 05 a 07 de novembro de 2019, na qualidade de Apresentador(a), na categoria pôster, do trabalho: Efeito do aleitamento em livre demanda (overfeeding neonatal) e da dieta rica em carboidrato simples (high sugar) sobre o grau de adiposidade e metabolismo de ratos jovens., de autoria de: THAIS ARAUJO BARUD, ISABELA JESUS DE DEUS, DANIEL MUNIZ OKUSHIMA ALVES, MILIANE MARTINS DE ANDRADE FAGUNDES, Ângela Antunes Silva, Cláudia Martins Carneiro, Karina Barbosa de Queiroz, Daniela Caldeira Costa.

Ouro Preto, 07 de novembro de 2019

Autenticidade



 Código: 157306232525dc306d0a1c31



 Prof. Marco Eduardo Cavalli G. Krupp

 Pro-Reitor de Exatidão



 Prof. Dr. Tainá Rossi Gaston

 Pro-Reitora de Graduação

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados



 50 UFOP



 2019

encontro de

 saberes

 Universidade Federal de Ouro Preto