



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



PROGRAMAÇÃO METABÓLICA PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA ESTEATOSE
HEPÁTICA INDUZIDA POR DIETA HIGH-SUGAR EM RATOS JOVENS

EDUARDA DOS SANTOS

Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

2021

EDUARDA DOS SANTOS

PROGRAMAÇÃO METABÓLICA PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA ESTEATOSE
HEPÁTICA INDUZIDA POR DIETA HIGH-SUGAR EM RATOS JOVENS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Escola de Nutrição da Universidade Federal de
Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção
do grau de Bacharel em Nutrição.

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

Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil

2021

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

S237p Santos, Eduarda Dos .

Programação metabólica previne o desenvolvimento da esteatose hepática induzida por dieta high-sugar em ratos jovens. [manuscrito] / Eduarda Dos Santos. - 2021.
62 f.: il.: color., gráf., tab..

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

1. Dieta de alto carboidrato. 2. Esteatose hepática. 3. Lactação. 4. Epigenética. I. Queiroz, Karina Barbosa de . II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 612.39

Bibliotecário(a) Responsável: Sônia Marcelino - CRB6/2247



21/10/2021 20:07 SEI/UFOP - 0235755 - Folha de aprovação do TCC

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
REITORIA
ESCOLA DE NUTRICAÇÃO DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

Eduarda dos Santos

Programação metabólica previne o desenvolvimento da esteatose hepática induzida por dieta high-sugar em ratos jovens

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

Aprovada em 16 de julho de 2021

Membros da banca

Doutorado - Karina Barbosa de Queiroz - Orientador(a) (Universidade Federal de Ouro Preto)

Doutorado - Sílvia de Paula Gomes - Universidade Federal de Ouro Preto

Doutorado - Melina Oliveira de Souza - 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 21/10/2022



Documento assinado eletronicamente por **Karina Barbosa de Queiroz, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 21/10/2021, às 16:22, 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 **0235755** e o código CRC **2B8BDDFD**.

Referência: Caso responda este documento, indicar expressamente o Processo nº 23109.011140/2021-33

SEI nº 0235755

R. Diogo de Vasconcelos, 122, - Bairro Pilar Ouro Preto/MG, CEP 35400-000 Telefone: 3135591844 - www.ufop.br

Dedico este trabalho, inteiramente, à minha irmã,
Natalia dos Santos (*in memoriam*), mulher que foi e
sempre será a minha inspiração e motivação de vida.

AGRADECIMENTOS

Sem sombra de dúvidas eu agradeço a Deus por toda a força que têm me proporcionado nesta caminhada, obrigada por sempre saber o que é melhor para a minha evolução pessoal, e por ter feito de mim.

Aos maravilhosos Maria Helena Soares e Idelfonso Pereira por todos os ensinamentos nestes 23 anos de vida, por dedicarem a vida a minha educação, por ensinarem sobre a honestidade, o amor, o companheirismo e por serem o meu principal motivo para voltar.

A minha sobrinha-filha, Milena, por ser a minha motivação diária para conquistar o melhor para nós.

A professora Dr^a. Karina Barbosa de Queiroz por contribuir tanto para a minha formação acadêmica e pessoal, por todas as discussões construtivas que contribuíram para o surgimento deste trabalho. Ainda, por toda a compreensão, gentileza e amor transmitidos durante estes 3 anos juntas. Você é uma mulher ímpar, admirável em todos os aspectos, e a inteligência que você carrega consigo é fascinante, todas as reuniões com você são extraordinárias e enriquecedoras. Obrigada por toda a dedicação a este trabalho que construímos juntas.

Ao excelente grupo do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da UFOP, por todos os auxílios que foram de extrema importância para cada passo desta pesquisa. À técnica, Miliane Fagundes o meu muito obrigada por todos os momentos que você dedicou aos experimentos que fiz, por sempre acompanhar e cuidar para que tudo saísse como planejado, por sempre deixar tudo organizado para o experimento e, por fim, agradeço aos ensinamentos de vida e pela energia e alegria que você transmitia durante o nosso contato no laboratório. À minha irmã de universidade, Isabela Jesus, que sempre dedicou uma parte do seu precioso tempo para sanar algumas dúvidas, por sempre ser extremamente gentil e cuidadosa ao discutir sobre o trabalho. E por toda a atenção aos meus sentimentos, você é singular, amo-te. À Thaís Araújo e ao Daniel Okushima por todas as excelentes contribuições. As maravilhosas companheiras, moradoras da República Bem na Boca (BNB), por todos os inúmeros momentos bons juntas e por todo o apoio. Vocês não fazem ideia do quanto eu sou feliz morando com vocês. O meu maior presente foi poder ter essa experiência única de encontrar uma família na reta final da graduação. Agradeço, imensamente, à Daniela Lorga por todas as conversas, por dividir comigo tudo o que sabe sobre Nutrição e tudo o que sabe sobre amizade; você foi o anjo provedor deste contato Eduarda-BNB. À Aline Bernardes, por compartilhar seus sentimentos e inúmeros outros conhecimentos sobre a vida, e por ser exemplo de mulher decidida. E, além disso, por incentivar a leitura e também a buscar o meu

novo caminho. À Tayná, por ser tão expressiva e transparente quanto eu; à Ana Favero, por todo o amor e companheirismo; à Juliana Bhering (tóxica), por demonstrar sempre que possível todo o seu amor e por cuidar de mim como eu mereço. Eu, certamente, faria uma segunda graduação só para morar mais 5 anos com vocês. Obrigada por existirem!

As minhas amigas, amoras, Clécia Teixeira e Mariana Cassemira, por sempre acreditarem no meu potencial e vibrarem com cada nova conquista, pelo ombro, ouvidos e braços amigos que sempre me acolheram nos momentos sensíveis. Também por todos os convites para a pizzeria!

À Catarina Verona, Gabriela Araújo, Camila Laisla, Natalia Gonzaga e Sirlaine Pio por compartilharem bons momentos e por aturarem a minha extrema felicidade às 7h da manhã!

Os meus sinceros agradecimentos aos laboratórios, professores e técnicos que apoiaram o desenvolvimento deste trabalho. O Laboratório de Bromatologia, coordenado pela professora Melina Oliveira e pelo técnico Rafael Antônio; o Laboratório de Multiusuários de Pesquisa da Escola de Nutrição coordenado pela Gustavo Silveira; agradeço por disponibilizarem tempo e conhecimento para que as análises fossem possíveis. Ao Centro de Ciência Animal (CCA) e a Érika Cristina da Silva Oliveira Siqueira por todo o empenho em manipular o tamanho das ninhadas dos animais para que esta pesquisa ocorresse como previsto. Ao Laboratório de Bioquímica metabólica (LBM), à professora Daniela Caldeira e a doutoranda Sttefany Gomes, por auxiliarem na compreensão e realização dos experimentos bioquímicos. À professora Claudia Martins Carneiro, do Laboratório de Imunopatologia (LIMP). À Carolina Nogueira técnica do Laboratório Multiusuário de Microscopia Avançada e Microanálise (Lmu-mam) do NUPEB.

Aos animais que foram essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa e que contribuíram de maneira significativa com a ciência. Muito obrigada!

Agradeço também a Universidade Federal de Ouro Preto e à Escola de Nutrição, aos professores e funcionários por favorecerem o meu desenvolvimento acadêmico e pessoal de forma única.

“As pessoas podem não lembrar exatamente o que você fez, ou o que você disse, mas elas sempre lembrarão de como você as fez sentir.”

Maya Angelou

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismo de sinalização da insulina e metabolismo hepático.	21
Figura 3 – Delineamento experimental: redução da ninhada (P0) e ingestão da STD e HSD durante 8 semanas de experimento.	26
Figura 4 – Impacto na manipulação do tamanho da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame dos animais.	33
Figura 5 – Determinação dos efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o peso relativo do fígado após 8 semanas de experimento.	41
Figura 6 – Grau de esteatose hepática dos animais submetidos aos efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame após 8 semanas de experimento.	42
Figura 7 – Efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o teor de lipídeos hepáticos dos animais após 8 semanas de experimento.	43
Figura 8 – Efeito da programação metabólica induzida pela redução da ninhada e HSD sobre o desenvolvimento da EH após 8 semanas de consumo.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre a ingestão alimentar, o CEA e o CGPCC dos animais após 8 semanas de experimento.....	34
Tabela 2 – Efeito do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o ganho de massa corporal, índice de Lee e índice de adiposidade após 8 semanas de experimento.	36
Tabela 3 – Efeito do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o colesterol total e o TAG séricos após 8 semanas de experimento.	38
Tabela 4 – Efeito do tamanho da manipulação da ninhada e da dieta pós-desmame sobre os parâmetros glicometabólicos dos animais após 8 semanas de experimento.	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AUC:	Área Sob a Curva
CCA:	Centro De Ciência Animal
CEA:	Coefficiente de Eficiência Alimentar
CEUA:	Comissão de Ética na Utilização de Animais
CGPCC:	Coefficiente de Ganho de Peso por Consumo Calórico
COL:	Colesterol total
DMSO:	Dimetilsulfóxido
HSD:	<i>High-Sugar Diet</i> , dieta rica em carboidratos simples
IA:	Índice de Adiposidade
IL:	Índice de Lee
IQR:	Intervalo Interquartil
IR:	Receptor da Insulina
MOGAT:	Monoacilglicerol Aciltransferase 1
NC:	Ninhada Controle
NR:	Ninhada Reduzida
OMS:	Organização Mundial da Saúde
P0:	Tempo Zero
RI:	Resistência à Insulina
S.D:	Desvio Padrão
STD:	Dieta Padrão
TA:	Tecido Adiposo
TAG:	Triglicerídeos
TTG:	Teste de Tolerância à Glicose

RESUMO

Tanto a lactação quanto o consumo alimentar durante as janelas críticas do desenvolvimento afetam as respostas adaptativas que descrevem a ligação entre as primeiras experiências nutricionais e o surgimento de doenças crônicas na idade adulta. A manipulação do tamanho da ninhada promove a programação metabólica nos animais e seus efeitos sobre o estabelecimento da resistência à insulina (RI), tanto sistêmica quanto hepática, são controversos. Ainda, o influxo de lipídeos para o fígado neste modelo, resultando em esteatose hepática (EH) precisa ser compreendido. Portanto, nosso objetivo foi avaliar o efeito da redução da ninhada e da dieta pós-desmame rica em carboidratos simples (high-sugar diet – HSD) após 8 semanas sobre o surgimento da EH. Após o nascimento, ratos Wistar machos (n=37) foram distribuídos em ninhada reduzida (NR, n=18; 4 filhotes/mãe) e ninhada controle (NC, n=19; 8 animais/mãe). Após o desmame (21 dias), os animais foram novamente divididos em 4 grupos: (i) e (iii) animais NC alimentados com dieta padrão (STD – NC; n=7) ou HSD (HSD – NC; n=8); (ii) e (iv) animais NR alimentados com STD (STD – NR; n=6) ou HSD (HSD – NR; n=8) por 8 semanas. Os animais foram avaliados em relação ao consumo alimentar e tiveram os parâmetros biométricos mensurados. Após a eutanásia, foram coletados o sangue, para análises bioquímicas e glicometabólicas, e o fígado, para análises histológicas ($p < 0,05$; ANOVA TWO-WAY, pós-teste Bonferroni). A manipulação da ninhada foi eficiente em induzir uma elevação de ~15% no peso corporal do grupo NR em relação ao NC ($p < 0,001$). O consumo alimentar foi alterado pelo tamanho da ninhada ($p < 0,05$) e dieta pós-desmame ($p < 0,001$), enquanto o coeficiente de eficiência alimentar (CEA) e o coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC) também apresentaram efeito da dieta ($p < 0,05$). Em relação aos parâmetros biométricos, apenas o índice de adiposidade (IA) foi alterado pela dieta ($p < 0,01$). O COL sérico foi influenciado pelo tamanho da ninhada ($p < 0,05$), enquanto o TAG sérico aumentou em decorrência do efeito do tamanho da ninhada ($p < 0,05$) da dieta pós-desmame e da interação ($p < 0,001$). Ainda, os parâmetros glicometabólicos foram influenciados pela dieta e interação ($p < 0,05$). Em relação ao grau de esteatose, observamos efeito da dieta pós-desmame e interação ($p < 0,001$), demonstrando uma redução de ~12% no grupo HSD-NR em relação ao HSD-NC. Do mesmo modo, o TAG hepático foi influenciado pela interação ($p < 0,05$), evidenciando uma redução de ~12,5% no grupo HSD-NR em relação ao HSD-NC. Dessa forma, a presente pesquisa demonstrou que a interação entre a redução da ninhada e a HSD preveniu o surgimento da EH desencadeada pela dieta pós-desmame. No entanto, futuros experimentos são necessários para comprovar os mecanismos por trás deste fenômeno.

PALAVRAS-CHAVE: dieta rica em carboidratos simples, redução da ninhada, programação metabólica, esteatose hepática.

ABSTRACT

Both lactation and food intake during critical developmental periods affect adaptive responses that describe the link between early nutritional experiences and the emergence of chronic diseases in adulthood. The litter size effect promotes metabolic programming in animals and its effects on the establishment of insulin resistance (IR), both systemic and hepatic, are controversial. Furthermore, the influx of lipids to the liver in this model, resulting in hepatic steatosis (HS) needs to be better understood. Therefore, our aim was to evaluate the effect of litter size reduction and post-weaning high-sugar diet (HSD) after 8 weeks on the development of HS. After birth, male Wistar rats (n=37) were distributed into reduced litter (NR, n=18; 4 pups/mother) and control litter (NC, n=19; 8 animals/mother). After weaning (21 days), the animals were divided into 4 groups: (i) and (iii) NC animals with standard diet (STD – NC; n=7) or HSD (HSD – NC; n=8); (ii) and (iv) NR animals fed with STD (STD – NR; n=6) or HSD (HSD – NR; n=8) for 8 weeks. The animals were evaluated in relation to food intake and had their biometric parameters measured. After euthanasia, blood was collected for biochemical and glycometabolic analyses, and liver for histological analysis ($P < 0.05$, TWO-WAY ANOVA, Bonferroni post-hoc). The litter size effect was efficient in increase ~15% in the NR group when compared to the NC ($P < 0.001$). Food intake was altered by litter size ($P < 0.05$) and post-weaning diet ($P < 0.001$), while CEA and CGPCC also had a post-weaning diet effect ($P < 0.05$). Regarding biometric parameters, only the adiposity index (AI) was altered by post-weaning diet ($P < 0.01$). Serum COL was influenced by litter size ($P < 0.05$), while serum TAG increased due to litter size effect ($P < 0.05$), post-weaning diet and interaction ($P < 0.001$). Also, the glycometabolic parameters were influenced by post-weaning diet and interaction ($P < 0.05$). Regarding the steatosis degree, we observed an effect of the post-weaning diet and interaction ($P < 0.001$), demonstrating a ~12% reduction in the HSD-NR group when compared to the HSD-NC group. Similarly, the hepatic TAG was influenced by the interaction ($P < 0.05$), showing a ~12.5% reduction in the HSD-NR group when compared to the HSD-NC group. Thus, the present study demonstrated that the interaction between litter size reduction and HSD prevented the emergence of HS triggered by the post-weaning diet. However, further experiments are needed to prove the mechanisms behind this phenomenon.

KEYWORDS: high-sugar diet, litter size effect, metabolic imprinting, hepatic steatosis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Fundamentação científica	17
1.1.1 Histórico da programação metabólica e seus mecanismos	17
1.1.2 Tamanho da ninhada e a relação com a programação metabólica	18
1.1.3 Consumo excessivo de carboidratos simples na infância e o desenvolvimento de resistência à insulina	19
1.1.4 Esteatose hepática induzida por manipulação da ninhada	22
2. OBJETIVO GERAL	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3. MATERIAIS E MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais e dieta.....	25
3.2 Análise do consumo	27
3.3 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros biométricos dos animais	27
3.1 Adiposidade corporal	27
3.4 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros glicometabólicos dos animais	27
3.4.1 Teste de tolerância à glicose (TTG)	27
3.4.2 Glicose Sérica	28
3.5 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre o perfil lipídico dos animais.....	28
3.5.1 Dosagem de colesterol total	28
3.5.2 Dosagem de triglicerídeos (TAG)	29
3.6 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre ao grau de esteatose dos animais	29
3.6.1 Confeção de lâminas histológicas e determinação do grau de esteatose	29
3.7 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre o teor de lipídeos totais do fígado.....	30
3.7.1 Peso relativo do fígado.....	30
3.7.2 Teor de lipídeos totais no fígado	30
3.7.3 Concentrações de colesterol total e TAG no fígado	31

3.8	Análise estatística	32
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1	Estabelecimento do modelo de ninhada reduzida.....	33
4.2	Análise do consumo e da eficiência alimentar dos animais após as 8 semanas de experimento.....	34
4.3	Análise dos parâmetros biométricos (ganho de massa, índice de Lee e índice de adiposidade) após 8 semanas de experimento	36
4.4	Análise do perfil lipídico sérico (TAG e colesterol total) após 8 semanas de experimento.....	38
4.5	Avaliação dos parâmetros glicometabólicos dos animais após 8 semanas de experimento	39
4.6	Avaliação das análises realizadas no fígado: peso relativo, grau de esteatose, teor de lipídeos totais, COL e TAG hepáticos	40
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6.	REFERÊNCIAS	48
7.	ANEXOS	60
	ANEXO 1 – Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)	60
	ANEXO 2 – Trabalho apresentado no Encontro de Saberes, Minas Gerais-Brasil, 2019.....	61
	ANEXO 3 – Trabalho apresentado no Encontro de Saberes, Minas Gerais-Brasil, 2020.....	62

1. INTRODUÇÃO

No período fetal e neonatal há um elevado crescimento e também desenvolvimento de órgãos que caracterizam essa fase como crítica ⁽¹⁻⁴⁾. Neste momento, o organismo está sujeito a programações metabólicas, as quais promovem alterações genéticas que contribuem para o seguimento de doenças na idade adulta ⁽¹⁻⁴⁾. Sugerindo que as experiências durante a infância refletem no estado de saúde ao longo da vida ⁽¹⁻⁴⁾. Do mesmo modo, tanto lactação quanto a ingestão alimentar durante a primeira infância provocam alterações fisiológicas e metabólicas que podem prevenir ou resultar no desenvolvimento de doenças crônicas, como a obesidade, a resistência à insulina (RI) e esteatose hepática (EH)⁽⁵⁻⁷⁾.

O ganho de peso acelerado em crianças com elevada ingestão energética está associado ao maior risco de desenvolver doenças na fase adulta ⁽⁸⁾. Além disso, os alimentos ultraprocessados como bolos, biscoitos, bolachas, sorvetes e refrigerantes contém elevadas concentrações de carboidratos simples que desregulam o metabolismo de lipídeos e carboidratos e podem alterar a sinalização da insulina por meio da inibição do receptor de insulina, da proteína fosfatinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) e também da proteína quinase B (Akt). Isso prejudica a transdução do sinal da insulina, resultando em hiperglicemia e produção elevada de triglicerídeos, que se depositam nos tecidos e resultam em obesidade e EH ^(7,9-12). Ainda, o excesso de açúcar dietético induz o aumento da ativação da lipogênese *de novo*, através da elevação da concentração de malonil-CoA, resultando em maior produção de lipídeos, uma vez que a RI eleva o influxo de ácidos graxos para os hepatócitos, reduz o transporte de TAG e também diminui a oxidação dos ácidos graxos, promovendo a deposição de lipídeos no fígado, caracterizando o desenvolvimento de EH ⁽¹³⁾. Os estudos desenvolvidos com animais criados em ninhada reduzida (NR) têm evidenciado que esta modificação na composição da ninhada gera uma programação metabólica, resultando em hiperfagia, obesidade, hiperglicemia, hiperleptinemia e EH ^(5-7,14). No fígado, a redução da ninhada eleva a concentração da enzima monoacilglicerol aciltransferase 1 (MOGAT1) que associado a alterações nas proteínas histonas promove a RI hepática na idade adulta ⁽⁷⁾. Contudo, os estudos são controversos, visto que alguns autores demonstram que a superlactação atenua a obesidade, o desenvolvimento RI na vida adulta e a EH, em decorrência da programação metabólica exercida pelas substâncias com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias que compõe o leite materno, e elevam a capacidade de oxidação de lipídeos hepáticos, diminuindo a deposição do mesmo neste tecido ^(51,69).

Ademais, animais submetido a *high-sugar diet* (HSD) apresentam alterações bioquímicas na ausência da modificação do peso corporal, bem como RI e EH ^(15,16). E com relação ao modelo de redução da ninhada, é amplamente discutido na literatura que animais criados em

ninhadas reduzidas apresentam sobrepeso neonatal ^(5,20-22). Ainda, dados preliminares do nosso grupo evidenciaram que a HSD elevou o índice de adiposidade dos animais, sem alterar a glicemia e aumentou as concentrações séricas de TAG ⁽²³⁻²⁵⁾. Além do mais, os animais submetidos à HSD desenvolveram RI após 8 semanas de consumo ^(21,22). Entretanto, a relação entre a redução da ninhada e o desenvolvimento de EH em ratos submetidos a dieta rica em carboidratos simples ainda não foi estabelecida.

Diante do exposto, nos questionamos quais seriam os efeitos da redução do tamanho da ninhada associada à introdução precoce de uma dieta rica em carboidratos simples sobre o desenvolvimento da EH. Será que a programação metabólica induzida pela redução da ninhada atenuaria a deposição de lipídeos nos hepatócitos após 8 semanas de consumo da dieta rica em carboidratos?

1.1 Fundamentação científica

1.1.1 Histórico da programação metabólica e seus mecanismos

O Conrad Hal Waddington foi o biólogo responsável por salientar a palavra epigenética para descrever um campo dos estudos biológicos que analisava a expressão de genes e proteínas em decorrência da interferência do ambiente ⁽²⁴⁾. E propôs, em 1957, um modelo epigenético intitulado “Paisagem Epigenética”, no qual demonstrava que o organismo estava sujeito a alterações provocadas por ações do ambiente intracelular e extracelular ⁽²⁵⁾. E, paralelamente, por volta de 1980, foram reconhecidas proteínas que compõem a cromatina e apresentam potencial efeito de modificar a expressão fenotípica, identificadas como proteínas de alta mobilidade ⁽²⁶⁾.

Além disso, autores como o David Barker ⁽²⁷⁾ evidenciou que o peso insuficiente no período pós-natal promove maior risco de diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares durante a fase adulta, potencializadas em decorrência da elevação excessiva do peso corporal durante a infância e a idade adulta, e devido a presença do sedentarismo ou tabagismo ^(27,28). Bem como o demonstrado por Dutch Hunger Winter, no qual observou que a ausência de alimentos durante o período gestacional estava associada a elevada pressão arterial, obesidade e alterações psicológicas ⁽²⁶⁾.

Do mesmo modo, evidências significativas demonstram que alterações nutricionais imediatamente pós-parto promove alterações metabólicas que permeiam ao longo do desenvolvimento ⁽²⁷⁾. Como exemplificado no estudo do Peter Hahn ⁽²⁸⁾, no qual ratos Wistar foram distribuídos em 4 filhotes por mãe e 14 filhotes por mãe, e, ao final do experimento, os filhotes criados em ninhadas reduzidas (4 filhotes/mãe) apresentavam maior concentração de colesterol e insulina plasmáticos quando comparados aos animais criados em ninhadas maiores (14 filhotes/mãe), demonstrando o efeito da programação metabólica em virtude da superalimentação promovida pela redução do tamanho da ninhada ^(7,28,29).

As alterações epigenéticas descrevem transformações na cromatina na ausência de modificações na sequência primária do DNA, e os mecanismos responsáveis amplamente estudados são: a metilação do DNA, a modificação das histonas e os RNAs não codificantes ^(7,30). Ademais, a metilação do DNA consiste na adição de um grupo metil, catalisado pela ação da enzima DNA metiltransferase, na citosina do dinucleotídeo citosina-guanina, descritos como ilhas CpG, a qual corresponde a região promotora do DNA ⁽³¹⁾. Além do mais, as alterações dietéticas estão fortemente associadas ao processo de metilação do DNA através do fornecimento de substratos e cofatores que atuam no processo ⁽³²⁾.

Paralelamente, a metilação do DNA influencia a metilação das histonas, proteínas que atuam no empacotamento do DNA, e são sensíveis às alterações que podem resultar em modificação da expressão gênica, uma vez que o processo de metilação resulta em interações específicas do grupo metil com as proteínas empacotadoras, permitindo a atuação de outras proteínas que tem a função de acrescentar ou remover modificações pós-traducionais ^(26,30,33). Os RNAs não codificantes são distribuídos em duas classes: os grandes e curtos RNAs. Eles atuam no processo de diferenciação, desenvolvimento e estabilidade genética e são transmitidos de geração para geração; portanto estão sujeitos às alterações durante as gerações e podem resultar no silenciamento de genes ⁽³³⁻³⁵⁾. Em suma, as experiências durante os períodos críticos do desenvolvimento, como período fetal, neonatal e durante as transições alimentares, provocam alterações epigenéticas que, em conjunto, promovem modificações que são transmitidas dos gametas parentais para os zigotos filiais, promovendo o desenvolvimento de doenças crônicas, como a esteatose hepática, na idade adulta ^(6,36).

1.1.2 Tamanho da ninhada e a relação com a programação metabólica

O período pós-natal precoce é um dos momentos sensíveis do desenvolvimento, o qual está sujeito a diversas alterações epigenéticas, uma vez que nessa fase da vida alguns órgãos e sistemas prosseguem o desenvolvimento ⁽²⁾. Ademais, os roedores e os humanos são exemplos de espécies que apresentam constante maturação nesse período ⁽²⁾. E as evidências apontam que as modificações epigenéticas que ocorrem no período fetal podem sofrer alterações no período pós-natal, principalmente no fígado que desenvolve as funções após o parto ^(3,4,37).

Os modelos animais são amplamente estudados, visto que possibilitam visualizar a influência da programação metabólica no desenvolvimento do organismo em um curto período ⁽²⁷⁾. Um dos experimentos mais realizados é a manipulação da ninhada, como, por exemplo, a redução do tamanho da ninhada, constituída por 3 a 4 filhotes por mãe e em contrapartida, a ninhada controle contém de 8 a 12 filhotes por mãe ^(6,29). Ademais, essa alteração permite avaliar os efeitos do elevado ganho de peso de forma rápida, uma vez que essa alteração no número de animais permite que a ninhada reduzida ingira maior quantidade de leite quando comparada a ninhada controle, promovendo o processo de superalimentação que resulta em aumento do peso corporal e prejuízos na homeostase energética dos animais ^(5,29,37).

De acordo com a literatura, a redução do número de animais na ninhada resulta em aumento da ingestão alimentar, hiperglicemia e hiperinsulinemia, que perpetua até a idade adulta ^(6,38). Ademais, Plagemann e cols. ⁽³⁹⁾ apontam que a superalimentação pós-natal promove a

metilação do gene precursor da proopiomelanocortina (POMC), alterando a resposta à saciedade e resultando em hiperfagia ⁽³⁹⁾. Além disso, a superalimentação pós-natal também provoca a metilação do gene precursor do receptor de insulina que, em longo prazo, gera RI⁽⁴⁰⁾. Ramon-Krauel e cols. ⁽⁷⁾ demonstraram que esse modelo experimental contribui para a elevação da enzima MOGAT1 e para modificações pós-traducionais nas proteínas histonas no fígado, promovendo a RI neste órgão ⁽⁶⁾. Isso ocorre porque a MOGAT atua na conversão de monoacilglicerol em diacilglicerol (DAG), o qual que será, posteriormente, convertido em triglicerídeos nos hepatócitos, contribuindo para a deposição de lipídeos nestas células ⁽⁶⁾.

Entretanto, alguns resultados controversos são descritos na literatura, uma vez que a ingestão do leite materno contribui com modificações epigenéticas que podem atenuar o surgimento de alterações metabólicas na vida adulta, em decorrência da extensa variedade de componentes do leite materno (macronutrientes, micronutrientes, microRNAs e prebióticos) ^(17,18). Estes componentes contribuem para resultados melhores em relação ao desenvolvimento durante a infância e previne o surgimento de doenças na idade adulta ^(17,18). A presença de oligossacarídeos no leite contribui com a formação de uma microbiota saudável com maior capacidade de produção de ácidos graxos de cadeia curta, e também reduz a deposição de lipídeos nos tecidos ^(41,42). Ademais, Raychaudhuri e cols. ⁽⁴³⁾ demonstraram os animais sujeitos a ingestão do leite materno apresentaram menor metilação do gene promotor do *Slc2a4* que atua na codificação da proteína GLUT-4, quando comparado aos animais que receberam fórmula com maior concentração de carboidratos ⁽⁴³⁾. A ingestão excessiva de carboidratos reduziu a expressão de GLUT-4 no músculo, contribuindo com o surgimento da RI ⁽⁴³⁾. Dessa forma, a modulação do tamanho da ninhada promove alterações epigenéticas que podem resultar em malefícios ou benefícios a saúde; portanto, seus efeitos necessitam ser mais bem compreendidos ^(7,44).

1.1.3 Consumo excessivo de carboidratos simples na infância e o desenvolvimento de resistência à insulina

Os bebês e crianças apresentam uma forte inclinação a ingerir bebidas ou alimentos com sabor doce, visto que são imediatamente expostos ao leite materno, o qual é constituído de 7g de lactose/100mL de leite materno e apresenta um sabor doce maior que o leite de vaca ⁽⁴⁵⁾. Sendo assim, os bebês demonstram, posteriormente, uma maior preferência a esse sabor, e as futuras interações alimentares ditam as preferências ao longo da vida ⁽⁴⁶⁾. Ademais, as

ingestões alimentares durante essa fase inicial do desenvolvimento descrevem a trajetória do estado de saúde desses indivíduos ⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾.

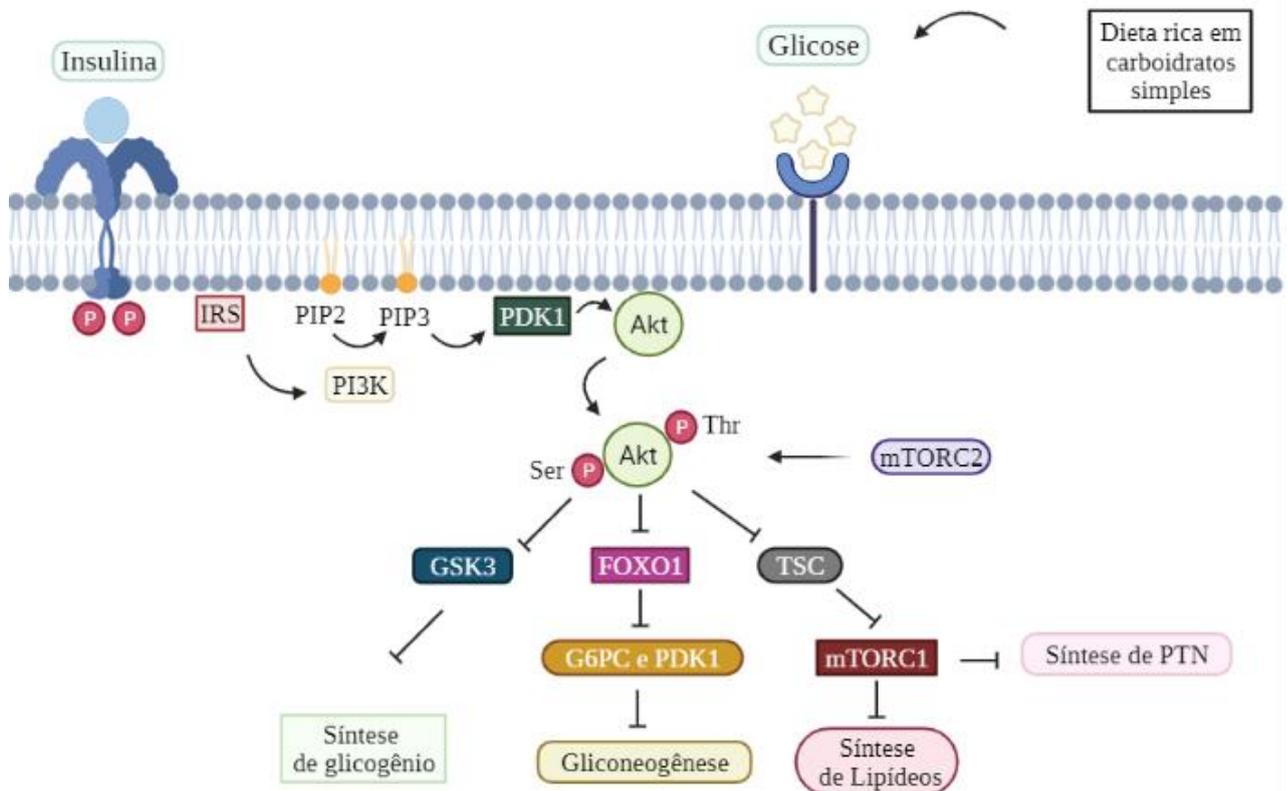
O acesso ao leite materno é de extrema importância para o desenvolvimento adequado do bebê e, por isso, é fortemente incentivado pela Organização Mundial da Saúde ⁽⁵⁰⁾ que recomenda a oferta exclusiva de leite materno para bebês até os seis meses ^(50,51). Uma das justificativas para tal recomendação é a presença de compostos bioativos, como hormônios e outras substâncias, que atuam modulando o metabolismo do recém-nascido, enquanto os órgãos estão em processo de maturação, prevenindo o desenvolvimento de doenças inflamatórias e também o desenvolvimento de obesidade, uma vez que regulam o crescimento durante a infância através da programação da homeostase energética ^(52,53).

Notavelmente, a introdução imediata de alimentos sólidos ricos em açúcar durante a primeira fase da vida provoca alterações metabólicas, que podem culminar em sobrepeso ou obesidade durante a infância ou promover a saúde na fase adulta ^(9,26,27). Os autores Harding ⁽⁵⁶⁾ e Coupé ⁽⁵⁷⁾ sugeriram que o hormônio insulina e o IGF-1, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, estão relacionados com o desenvolvimento fetal e com a homeostase da glicose. Além do mais, o IGF-1 continua exercendo efeito na ingestão alimentar em fases posteriores ^(56,57).

A insulina é um hormônio anabólico que atua promovendo a homeostase da glicose através de receptores presentes na membrana dos tecidos-alvo como o tecido adiposo, músculo esquelético e fígado, resultando em inúmeras reações em resposta a concentração de nutrientes plasmáticos⁽²⁸⁾. No fígado, após a ingestão de alimentos, a insulina atua regulando a síntese glicogênio, lipídeos e proteínas, no entanto, promove a inibição da gliconeogênese e também da glicogenólise⁽²⁸⁾. Ademais, na membrana plasmática dos hepatócitos estão presentes os receptores de insulina 1 e 2, IR1 e o IR2 que ao detectarem a ligação deste hormônio, promovem alterações estruturais na subunidade β do receptor de

insulina, resultando em autofosforilação em resíduos de tirosina ⁽⁶⁸⁾. Bem como, a consequente ativação do substrato do receptor da insulina, permitindo a ligação do mesmo ao receptor o que resulta na ativação do receptor de insulina, promovendo a cascata de reações das proteínas cinases ^(67,68), como descrito na Figura 1 a seguir.

Figura 1 – Mecanismo de sinalização da insulina e metabolismo hepático.



A insulina se liga ao receptor, promove a modificação na estrutura da subunidade β , resultando em autofosforilação dos resíduos de tirosina do receptor de insulina. Por sua vez, ocorre a ativação do IRS1 e ligação do receptor da insulina, promovendo a cascata de reações. O PI3K é ativado ao se ligar ao IRS1, resultando na transformação de PIP2 em PIP3. O PIP3 ancora a PDK1 permitindo a ativação da Akt. A Akt inibe a GSK3, resultando na produção de glicogênio, inibe a FOXO1, contribuindo com a inibição da gliconeogênese. Ainda, a Akt inibe a TSC ativando a mTORC1, resultando na síntese de lipídeos. PI3K: fosfoinositídeo-3-quinase; PIP2: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; PIP3: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; PDK1: quinase 1 dependente de fosfoinositídeo; Akt: proteína-quinase B; GSK3: glicogênio sintase quinase-3- β ; FOXO1: fator de transcrição 1; G6PC: glicose-6-fosfatase; mTORC1: complexo de rapamicina 1; mTORC2: complexo de rapamicina 2.

Fonte: Adaptado de Titchenell; Lazar; Birnbaum, 2017; Santoleri; Titchenell, 2019. BioRender, 2021. Disponível em: <https://biorender.com/>. Acesso em: 01 de julho de 2021.

A autofosforilação do receptor de insulina é causada pela ligação da insulina ao receptor que ativa o fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K), resultando na fosforilação do lipídeo de membrana, o fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), o convertendo em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), resultando na ativação da cascata de proteínas-cinases ^(28,29). Por sua vez, a PIP3 se projeta para o interior da célula, resultando na ativação da segunda cascata de reações das proteínas cinases, essa proteína ancora a cinase-1 dependente de fosfoinositídeo (PDK1), e também a proteína cinase B (Akt), resultando na ativação da mesma ⁽²⁹⁾.

Em seguida, a Akt inibe a glicogênio-sintase-cinase (GSK3) tornando-a ativa, forma não fosforilada, resultando na redução da síntese de glicogênio ^(28,29). Além do mais, a Akt inibe o fator de transcrição FOXO1, impedindo a produção de glicose e inibe a mTORC1 que atua controlando a expressão de genes que agem na via da lipogênese e também na síntese proteica⁽²⁹⁾.

Ainda, a via da lipogênese *de novo* interfere na síntese de lipídeos e pode determinar a deposição de lipídeos nos hepatócitos ^(28,31). Pois, a via relacionada a produção de lipídeos é regulada pela ingestão excessiva de carboidratos simples, uma vez que a ingestão exacerbada de açúcar está associada a elevadas taxas de EH ⁽³¹⁾. E também, a RI potencializa o desenvolvimento da EH, à medida que a sinalização deste hormônio se encontra comprometida em decorrência da fosforilação do resíduo de serina do receptor impedindo a transdução do sinal, e consequentemente modifica a ação da insulina, gerando a RI, visto que a redução da expressão dos principais componentes desta via como o IRS, Akt entre outros podem promover a RI ^(30,32). E que por sua vez, interfere na inibição da via relacionada a produção de lipídeos, resultando em produção exacerbada de lipídeos, maior influxo e menor oxidação de ácidos graxos livres nos hepatócitos ^(32,33).

1.1.4 Esteatose hepática induzida por manipulação da ninhada

A deposição exacerbada de lipídeos nos hepatócitos, ou seja, a EH provoca alterações no metabolismo e no órgão. Também, é uma patologia intimamente relacionada à presença da obesidade e a RI ^(28,35). Ademais, o modelo experimental de redução da ninhada possibilita observar as alterações metabólicas relacionadas à elevação abrupta do peso corporal, como a RI, intolerância reduzida à glicose e EH ^(5,6,36).

Além do mais, a deposição de lipídeos nos hepatócitos ocorre por meio de dois processos complementares como a via lipogênese de novo (glicerol-3-fosfato) e da via monoacilglicerol aciltransferase (MOGAT) ⁽⁶⁾. No fígado, as enzimas da via MOGAT atuam convertendo monoacilglicerol em DAG que, posteriormente, é convertido TAG ⁽⁶⁾. Na ausência de doenças crônicas como a obesidade e a EH, há uma baixa expressão dos genes que regulam a via MOGAT, MOGAT1 e MOGAT2, resultando em uma ativação sutil desta via ⁽⁶⁾. Todavia, na presença das comorbidades citadas anteriormente há uma forte ativação da MOGAT1, indicando uma relação da ativação exacerbada desta via com a maior produção e deposição de lipídeos nos hepatócitos ⁽⁶⁾. Bem como foi demonstrado por Ramon-Krauel ⁽⁶⁾, em um estudo com roedores, no qual observaram uma acentuada ativação da MOGAT1 no fígado de animais

criado em ninhadas reduzidas ⁽⁶⁾. Ademais, a programação metabólica exercida pela redução do tamanho da ninhada promove alterações nas proteínas histonas, resultando em alterações persistentes na MOGAT1 que contribui, parcialmente, para o desenvolvimento de RI e EH ⁽⁶⁾. Do mesmo modo, esse quadro está associado à elevada concentração de insulina que estimula a síntese de TAG e a lipogênese *de novo*, bem como está associado à uma redução na exportação hepática das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL), culminando em uma maior deposição de lipídeos nos hepatócitos ^(28,33). Outro possível mecanismo relacionado à epigenética foi demonstrado por Fang Huang e cols. ⁽³⁷⁾, que observaram que a manipulação do tamanho da ninhada estava associada ao aumento da expressão de microRNA-221 que inibe tanto a expressão quanto a fosforilação da via PI3K/AKT, resultando em elevada produção de TAG e alteração do metabolismo da glicose ⁽³⁷⁾.

Diante do exposto, iremos apresentar os dados referentes à nossa pesquisa, a qual demonstrou que a programação metabólica induzida pela redução da ninhada preveniu o surgimento da EH desencadeada pelo consumo da dieta pós-desmame, rica em carboidratos simples, após 8 semanas de experimento. Apesar de não termos identificado o mecanismo completo, estes resultados são bastantes promissores e podem direcionar futuros experimento para comprovar os mecanismos por trás deste fenômeno.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da programação metabólica sobre o desenvolvimento da esteatose hepática (EH) induzida por dieta rica em carboidratos simples (HSD) em ratos Wistar jovens após 8 semanas de experimento.

2.1 Objetivos específicos

- ✓ Validar o modelo experimental da ninhada reduzida e resistência à insulina (RI) induzida por HSD;
- ✓ Determinar os efeitos da redução da ninhada e da HSD sobre o grau de esteatose dos animais após 8 semanas experimento;
- ✓ Avaliar os efeitos da redução da ninhada e da HSD sobre os parâmetros do fígado (peso relativo, teor de lipídeos totais, colesterol e triglicerídeos) após 8 semanas de experimento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

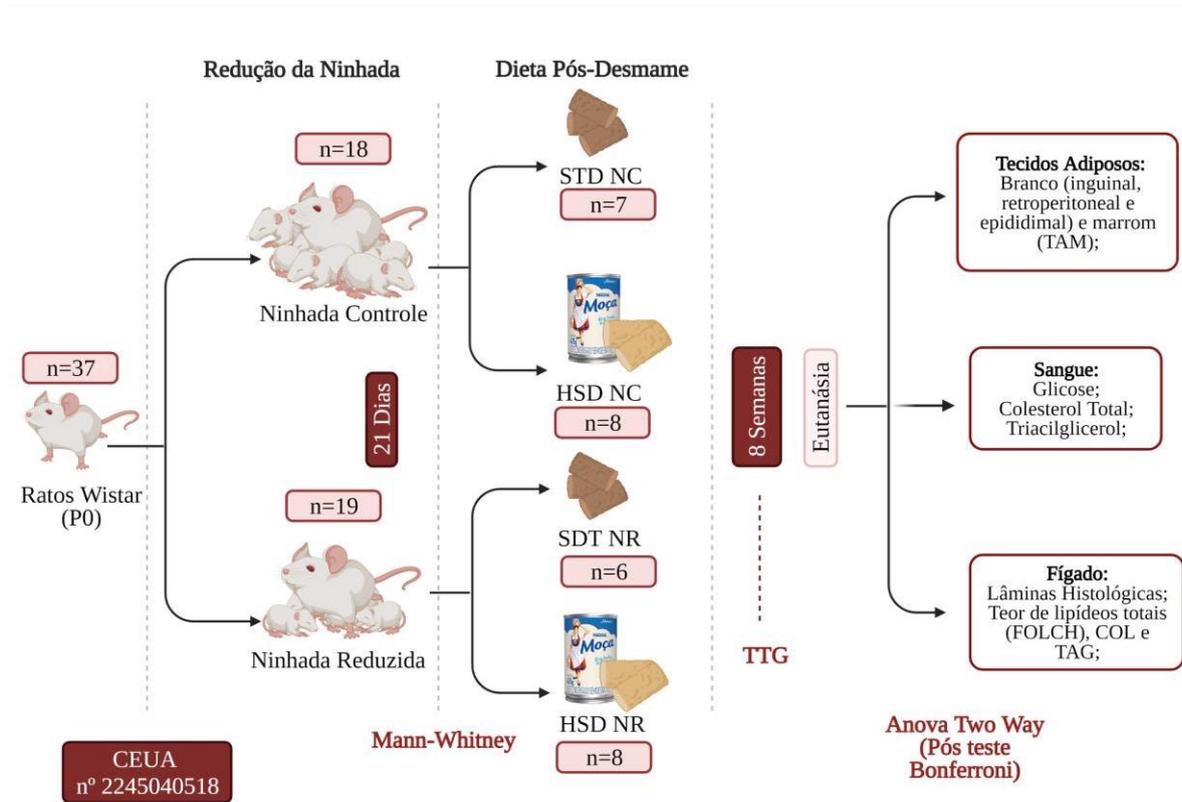
Os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com o número de protocolo 2245040518, ANEXO 1.

3.1 Animais e dieta

Os animais utilizados neste estudo foram ratos machos, recém-nascidos, da linhagem Wistar (n=37), criados no Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP. Os animais foram distribuídos aleatoriamente, após o nascimento, em dois grupos: ninhada controle – NC (n=19), caracterizada pela presença de 8 animais por mãe e ninhada reduzida (NR) (n=18), caracterizada pela presença de 4 animais por mãe ⁽⁶⁹⁾.

Após o desmame os animais foram redistribuídos em 4 grupos: Grupo i (n=7) animais alimentados com dieta padrão STD, ninhada controle (STD – NC); Grupo ii (n=8) animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples (HSD), ninhada controle (HSD – NC); Grupo iii (n=6) animais alimentados com dieta padrão (STD), ninhada reduzida (STD –NR); Grupo iv (n=8) animais alimentados com dieta rica em carboidratos simples, ninhada reduzida (HSD – NR), conforme o descrito na Figura 1 a seguir:

Figura 2 – Delineamento experimental: redução da ninhada (P0) e ingestão da STD e HSD durante 8 semanas de experimento.



A manipulação da ninhada foi realizada como previamente publicado ⁽¹⁾, na qual a ninhada controle era composta por oito filhotes por mãe e a ninhada reduzida por quatro filhotes por mãe. STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples; NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; P0, pós nascimento.

Fonte: Elaboração própria. BioRender, 2021. Disponível em: <https://biorender.com/>. Acesso em: 01 de julho de 2021.

A dieta controle (STD) foi constituída por ração comercial Nuvilab® (Nuvital-CR, Colombo, Brasil), e dieta rica em carboidratos simples (HSD) por 33% de ração comercial Nuvilab, 33% de leite condensado Moça Nestlé, 7% de açúcar cristal e o remanescente em água. Ademais, o período experimental teve duração de 8 semanas, os animais foram mantidos em temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas. O peso corporal foi aferido semanalmente, enquanto o consumo alimentar foi aferido três vezes por semana. Logo após, foi realizado teste de tolerância à glicose (TTG) e a eutanásia. Para realizar a eutanásia, inicialmente, os animais foram anestesiados por isoflurano (Isoforine, São Paulo, Brasil) e, em seguida, foram decapitados. Posteriormente, o sangue foi coletado para análise dos parâmetros bioquímicos e o fígado para confecção de lâminas histológicas e análise do grau de esteatose dos animais; as amostras foram armazenadas no freezer a -80°C para posteriores análises.

3.2 Análise do consumo

Para tal, o consumo foi analisado pelos cálculos de ingestão calórica, coeficiente de ingestão alimentar (CEA) e pelo coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC). A ingestão da ração em gramas consumidas pelo animal, semanalmente, foi multiplicada pelas calorias (Kcal) da respectiva ração consumida, obtendo assim a ingestão calórica dos animais. O valor das Kcal da STD e da HSD foram determinadas a partir da realização das análises bromatológicas, previamente publicadas pelo grupo, sendo 3,11 Kcal/ g e 2,81 Kcal/ g, respectivamente. O coeficiente de eficiência alimentar foi obtido a partir da relação entre o ganho de peso dos animais e a quantidade de ração ingerida, para esse fim, a seguinte fórmula foi utilizada: $CEA = (\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}) / \text{Quantidade total de ração ingerida no período (g)}$. E para o cálculo do coeficiente de ganho de peso por consumo calórico (CGPCC) foi utilizada a fórmula descrita a seguir: $CGPCC = (\text{Peso final (g)} - \text{Peso inicial (g)}) / \text{Kcal ingerida}^{(70)}$.

3.3 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros biométricos dos animais

3.1 Adiposidade corporal

O grau de adiposidade foi analisado através do índice de Lee, utilizando a seguinte fórmula: $[\sqrt[3]{\text{peso corporal} / \text{comprimento naso-anal (CNA)} \times 10}]$ (Lee, 1929) e do índice de adiposidade, através da fórmula a seguir: $[100 \times (\text{soma dos coxins adiposos} / \text{peso corporal})]$ (71).

3.4 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre os parâmetros glicometabólicos dos animais

3.4.1 Teste de tolerância à glicose (TTG)

Uma semana anterior ao TTG, os animais foram ambientados por cerca de 1h no laboratório, ou seja, as caixas dos animais eram colocadas nas áreas comuns do laboratório visando, dessa forma, reduzir o estresse com a manipulação dos animais. O TTG foi realizado um dia antes do procedimento da eutanásia. Os animais permaneceram de jejum por 6 horas antes de realizar a dosagem da glicemia plasmática nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos com o auxílio do glicosímetro digital Accu-Check Active® (Roche DiagnosticsCorp, Indianópolis,

IN), água ad libitum. O protocolo utilizado para esse experimento foi o proposto por Santos e col. ⁽⁷²⁾. Para dosar a glicose no tempo 0, a cauda do animal foi, inicialmente, anestesiada com lidocaína (Germed, Minas Gerais, Brasil) e em seguida recebeu um pequeno corte, a glicose foi dosada com o auxílio do glicosímetro digital Accu-Check Active®. Consequente, 1 ml de solução de glicose a 2mg/g peso foi injetada intraperitonealmente no terceiro quadrante da região abdominal do animal. Em ambas as regiões, cauda e abdome, utilizaram-se a lidocaína (Germed) a fim de reduzir a dor e o estresse do animal. Posteriormente, a glicemia foi medida a cada 30 minutos até atingir 120 minutos. Por fim, os animais voltaram a receber a dieta normalmente ⁽⁷²⁾.

3.4.2 Glicose Sérica

Para tal, o sangue foi coletado e em seguida centrifugado (Centribio, Paraná, Brasil) a fim de separar a amostra de soro necessária para esse experimento. Para a execução dessa análise foi utilizado um Kit Bioclin (BIOCLIN, Paraná, Brasil), seguindo as informações do fabricante. A dosagem da glicose sérica nos grupos submetidos a STD e a HSD foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, no qual ocorre a oxidação enzimática desse componente, seguida de liberação do peróxido de hidrogênio e formação um cromógeno vermelho cereja. A intensidade da cor é diretamente proporcional à quantidade de glicose presente na amostra. Essa dosagem foi realizada utilizando 5µL de amostra de soro para 245µL de reagente (diluição de 50×), em duplicata, utilizando placa de Elisa (KASVI, Paraná, Brasil). A leitura da absorbância foi feita com auxílio de um espectrofotômetro (BIOSPECTRO, Paraná, Brasil), utilizando o comprimento de onda de 505nm. Os cálculos foram realizados utilizando a seguinte fórmula: $\text{glicose (mg/dl)} = (\text{absorbância da amostra/absorbância do padrão}) \times 100$. Para expressar os resultados utilizamos o fator de correção de 0,0556 e eles foram expressos em mmol/L.

3.5 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre o perfil lipídico dos animais

3.5.1 Dosagem de colesterol total

Inicialmente, o sangue foi coletado e submetido ao processo de centrifugação (Centribio, Paraná, Brasil), com o intuito de separar a amostra de soro, na qual foi dosado o colesterol total. Para tal, foi utilizado um kit Colesterol Liquiform (Labtest Diagnóstico S.A, Minas Gerais, Brasil), seguindo as recomendações do fabricante, e o leitor de Absorbância em microplacas ELx808 (BIOSPECTRO, Paraná, Brasil). Esse experimento trata-se de um

método enzimático colorimétrico, no qual a enzima colesteroesterase degrada os ésteres de colesterol em ácidos graxos e colesterol livre, e as diversas reações geram antipirilquinonimina como produto final. A concentração de colesterol na amostra é indicada pela intensidade da cor vermelha. Para realizar os cálculos foi utilizada a seguinte fórmula: colesterol total (mg/dl) = (absorbância do teste – absorbância do padrão) × 200, os resultados foram expressos em mg/dL e a leitura de absorbância foi realizada em comprimento de onda de 500nm.

3.5.2 *Dosagem de triglicerídeos (TAG)*

A princípio o sangue foi coletado, centrifugado e a partir da amostra de soro obtida foi realizada a dosagem de triglicerídeos (TAG). Para tal, utilizamos o kit Triglicérides Liquiform (Labtest Diagnóstica S.A), seguindo as recomendações do fabricante, e um leitor de Absorbância em Microplacas ELx808 (Biospectro, Paraná, Brasil). Trata-se de um teste enzimático colorimétrico, no qual ocorre a degradação do TAG devido a ação das lipoproteínas lipases, liberando o glicerol que após passar por diversas reações tem como produto final a quinoneimina, responsável pela coloração vermelha, a intensidade dessa coloração é diretamente proporcional a quantidade de triglicérides na amostra. A leitura foi realizada utilizando comprimento de onda de 505nm. Foi utilizada a fórmula descrita a seguir para realização dos cálculos: TAG (mg/dl) = (absorbância do teste/absorbância do padrão) × 200. Os resultados foram expressos em mg/ dl.

3.6 *Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre ao grau de esteatose dos animais*

3.6.1 *Confecção de lâminas histológicas e determinação do grau de esteatose*

A fim de analisar o grau de esteatose dos ratos, o fígado foi previamente fixado em solução de Metanol 80% - Dimetilsulfóxido 20% (metanol – DMSO), (Metanol, Alphatec; Dimetilsulfóxido, Labsynth) em seguida foram mergulhados em parafina, cortados a uma espessura de 5 µm com o auxílio de um micrótomo, posteriormente o tecido foi corado com hematoxilina-eosina. E para determinar o grau de esteatose dos animais, as lâminas foram observadas utilizando Microscópio Óptico Digital Leica DM5000B com a objetiva de 40 × e a partir do software LeicaQwin V3 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Foram capturadas 19 imagens. A pontuação das lâminas foi realizada de acordo com o método semi-quantitativo descrito por Brunt⁽⁷³⁾. Para a análise das imagens foi utilizada uma malha

dividida em 10 quadrantes, no qual cada quadrante foi numerado de acordo com a quantidade de gotículas lipídicas presentes, sendo 0 o valor mínimo e 7 o valor máximo. Posteriormente, os valores encontrados em cada quadrante foram organizados em ordem decrescente e a mediana foi calculada. O valor obtido através do cálculo da mediana foi utilizado para classificar o grau de esteatose da imagem como ausente, discreto e moderado, sendo ausente = 0; discreto = 1,2,3; moderado = 4,5,6,7 ⁽⁷³⁾.

3.7 Análise dos efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da HSD sobre o teor de lipídeos totais do fígado

3.7.1 Peso relativo do fígado

Para determinar o peso relativo do fígado utilizamos a seguinte fórmula: peso relativo do fígado= (peso do fígado/massa corporal do animal).

3.7.2 Teor de lipídeos totais no fígado

Esse experimento foi realizado no laboratório de Pesquisa de Farmacognosia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto. A extração de lipídeos totais do fígado foi realizada utilizando o método de extração de lipídeos de FOLCH ⁽⁷⁴⁾. Para iniciar esse experimento, 16 tubos de ensaio foram reservados, todos foram devidamente higienizados com detergente neutro e em seguida foram secos em estufa simples (Tecnal, São Paulo, Brasil) a 105°C. Após atingirem a temperatura ambiente, 8 tubos foram identificados de 1 a 8 e os outros 8 tubos foram identificados 1.1 a 8.8. Estes tubos (1.1 a 8.8) foram lavados com Éter de petróleo (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil), a fim de se eliminar qualquer resíduo lipídico presente nos tubos. Posteriormente à evaporação completa do Éter de petróleo (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil), o peso inicial dos tubos foi aferido e anotado.

As amostras de fígado foram pesadas em balança analítica (Marte Científica, São Paulo, Brasil) de quatro casas decimais, sendo que o valor dessas amostras não poderia ser menor que 80 mg ou maior que 120 mg, para que não fosse necessário corrigir o valor das soluções utilizadas no experimento. Todo o experimento foi realizado utilizando luvas sem talco, para que não houvesse interferência de resíduos lipídicos das mãos do manipulador.

Inicialmente, a amostra foi colocada em um graal de cerâmica (Chiarotti, São Paulo, Brasil), e com o auxílio de uma pipeta automática (DsysLab, Paraná, Brasil) foi acrescentado 1000µL da solução de clorofórmio-metanol (2:1) (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil), e para macerar a solução até dissolver completamente, foi utilizado um pistilo de cerâmica (Chiarotti, São

Paulo, Brasil). Em seguida, foi adicionado mais 1000µL da solução de clorofórmio-metanol (2:1) (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil) e macerou até completa homogeneização da amostra. Posteriormente, a amostra macerada foi transferida para um tubo de ensaio com o auxílio de uma pipeta automática (DsysLab, Paraná, Brasil) e foi tampado com papel alumínio, para que o reagente não evaporasse. Após a realização dessa etapa, foram acrescentados 400µL de metanol (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil). O tubo de ensaio foi devidamente tampado e a amostra foi homogeneizada em vórtex (Phoenix Lufenco, São Paulo, Brasil) por 3 minutos; em seguida, o tubo foi centrifugado (Centribio) a $3000 \times g$ por 10 minutos. Posteriormente, o sobrenadante presente no tubo foi transferido com o auxílio de uma pipeta automática (DsysLab) para o segundo tubo, para cada amostra utilizou-se uma ponteira.

Logo após essa etapa, foram acrescentados 800µL de clorofórmio (Alphatec) em cada tubo e, seguidamente, 640µL de solução de NaCl 0,73% (Cloreto de Sódio, NaCl, Labsynth, São Paulo, Brasil) foi acrescentado em cada tubo com pressão, para homogeneizar a solução. Os tubos foram novamente homogeneizados em vórtex (Phoenix Lufenco, São Paulo, Brasil) por 1 minuto e depois foram centrifugados (Centribio, Paraná, Brasil) a $3000 \times g$ por 10 minutos. A posteriori, o sobrenadante foi descartado e 1000µL da solução de Folch (275,4µL de Clorofórmio, 4,407µL de Metanol e 4,314µL de Água destilada) (Alphatec) foram acrescentadas, lavando a parede do tubo para carrear todo o lipídio que estivesse presente. O tubo foi levemente agitado e o sobrenadante foi descartado.

Os tubos foram levados à estufa simples (Tecnal) a 80°C, semi-aberta, por 1 hora para completa evaporação do solvente. Após 1 hora, os tubos que ainda continham solvente foram deixados na estufa (Tecnal) a 55°C até completa evaporação. Os tubos que não apresentavam mais solvente foram retirados da estufa e armazenados no dessecador até atingirem a temperatura ambiente para aferir o peso final. Para calcular o teor de lipídeos presente no fígado, o peso final dos tubos foi aferido, e o teor de lipídeos foi calculado através da seguinte fórmula: % lipídeos = $(\text{Peso final do tubo} - \text{Peso inicial do tubo}) / \text{peso da amostra} \times 100$.

3.7.3 Concentrações de colesterol total e TAG no fígado

Esse procedimento foi realizado logo após a finalização do experimento que avaliou o teor total de lipídeos no fígado, o Folch ⁽⁷⁴⁾ A gordura que ficou retida nos tubos de ensaio foi ressuspendida utilizando 1mL de álcool isopropílico (Alphatec, Rio de Janeiro, Brasil), posteriormente os tubos foram homogeneizados durante 1 minuto.

Finalizando o processo de ressuspensão do lipídio presente na amostra, o colesterol total foi dosado utilizando o kit Colesterol Liquiform (Labtest Diagnóstico S.A, Minas Gerais, Brasil), conforme descrito nessa seção no tópico 4.4.1, e os triglicerídeos foram dosados com o auxílio do Kit Triglicérides Liquiform (Ref. 87; Labtest Diagnóstica S.A, Minas Gerais, Brasil), apresentado no tópico 4.4.2, ambos seguindo as orientações do fabricante.

3.8 Análise estatística

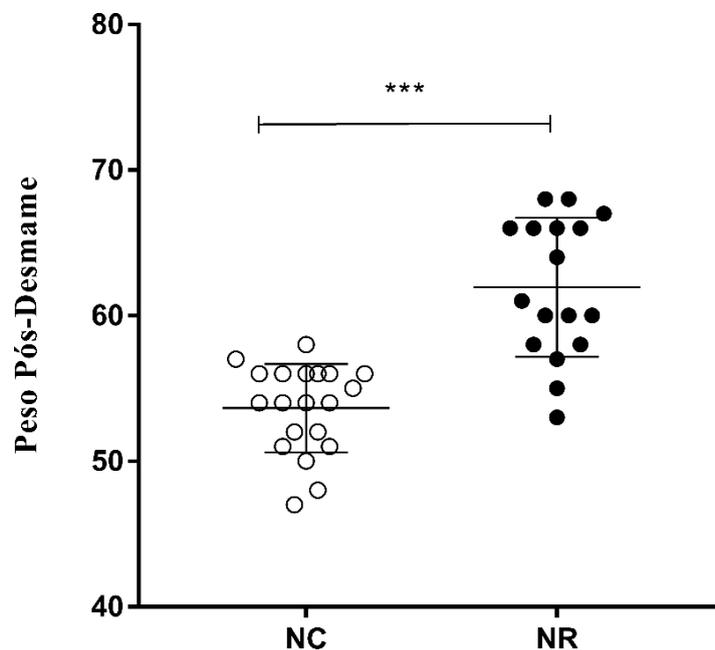
Essas análises foram realizadas no *GraphPadPrism (versão 6.0) software (GraphPad Software Inc., Irvine, CA)*. O teste de normalidade foi realizado utilizando o teste Shapiro-Wilk. Os efeitos da dieta e do tamanho das ninhadas foram analisados usando ANOVA *two-way*, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os dados paramétricos foram representados utilizando média \pm desvio padrão (S.D.), os não paramétricos foram representados utilizando a mediana e intervalo interquartil (IQR). A fim de classificar o grau de esteatose dos animais foi realizada a análise de contingência. O nível de significância dos resultados foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estabelecimento do modelo de ninhada reduzida

Este resultado, apresentado na Figura 3, é referente a manipulação do tamanho da ninhada realizado conforme descrito na seção Materiais e Métodos, na qual a ninhada controle (NC) era composta por oito filhotes por mãe e a ninhada reduzida (NR) por quatro filhotes por mãe.

Figura 3 – Impacto na manipulação do tamanho da ninhada sobre a massa corporal pós-desmame dos animais.



A manipulação da ninhada foi realizada como previamente publicado⁽¹⁾, na qual a NC era integrada por oito filhotes por mãe e a NR por quatro filhotes por mãe. A massa pós-desmame foi analisada por teste não paramétrico de Mann-Whitney e os dados foram representados como mediana \pm IQR. NC: ninhada controle; NR: ninhada reduzida. *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaboração própria.

Em conformidade com o descrito na Figura 3, observamos que o sobrepeso neonatal foi induzido pela manipulação do tamanho da ninhada ($p < 0,001$), resultando em 15,5% da elevação do peso corporal da NR em relação a NC. Plagemann e cols.⁽⁴⁰⁾ também utilizaram a mesma técnica para induzir o sobrepeso neonatal dos animais e demonstraram que os animais criados em pequenas ninhadas desenvolveram o excesso de peso a partir do sétimo dia pós-natal. Esses dados corroboram o presente resultado no qual os animais que são submetidos a ninhadas reduzidas artificialmente têm melhor desempenho lactacional e, portanto, desenvolvem o excesso de peso rapidamente^(7,27,75). Desse modo, os roedores que são

submetidos a redução do tamanho da ninhada apresentam maior peso corporal devido a incompleta maturação do hipotálamo, estrutura que atua no controle da saciedade dos animais, uma vez que o período pós-natal precoce caracteriza um período crítico do desenvolvimento, no qual o organismo está sujeito a alterações epigenéticas, o que pode resultar em alterações de órgãos ou eixos hormonais responsáveis por regular o metabolismo energético^(27,40). Desse modo, os animais apresentam alterações no sistema nervoso central, o qual atua no controle de saciedade, resultando em hiperfagia que causa aumento da ingestão energética, e consequente, elevação do peso corporal⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾.

4.2 Análise do consumo e da eficiência alimentar dos animais após as 8 semanas de experimento.

O consumo dietético dos animais foi avaliado considerando a quantidade em gramas e em Kcal da dieta ingerida, o grupo e a massa corporal dos animais. Na Tabela 1 a seguir, estão expostos os resultados referentes à ingestão alimentar (g), CEA e CGPCC, calculados conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

Tabela 1 – Efeito do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre a ingestão alimentar, o CEA e o CGPCC dos animais após 8 semanas de experimento.

	Ninhada controle		Ninhada reduzida		p-valor		
	STD-NC	HSD-NC	STD-NR	HSD-NR	Efeito do tamanho da ninhada	Efeito da dieta pós-desmame	Interação
Ingestão (g)	21,09±0,90	22,48±0,58*	21,82±0,81	23,25±0,93*	0,0289	0,001	0,9663
CEA	0,258±0,02	0,233±0,01*	0,242±0,02	0,227±0,01	0,0665	0,0019	0,4136
CGPCC	0,092(0,085-0,102)	0,087(0,078-0,088)	0,102(0,085-0,116)	0,095(0,078-0,968)	0,1257	0,0309	0,5970

Os dados paramétricos estão representados como média±SD e os dados não paramétricos como mediana e IQR. Os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram avaliados por ANOVA TWO-WAY, seguidos de pós-teste Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples; NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; CEA, coeficiente de eficiência alimentar; CGPCC, coeficiente de ganho de peso por consumo calórico.

Fonte: Elaboração própria.

A ingestão diária dos animais foi influenciada pelo tamanho da ninhada (p<0,05) e pela dieta pós-desmame (p<0,05), aumentando ~6,6% do grupo HSD-NC e HSD-NR em relação aos respectivos controles (STD-NC e STD-NR). O CEA apresentou efeito da dieta pós-desmame

($p < 0,01$), indicando uma redução de 9,4% do grupo HSD-NC em relação ao grupo STD-NC. O CGPCC também apresentou efeito da dieta pós-desmame ($p < 0,05$), porém, não foi identificado efeito no pós-teste.

Quanto à ingestão alimentar, Ramos e cols.⁽²⁾ apontaram que os animais submetidos à uma dieta rica em açúcar apresentam maior ingestão alimentar, uma vez que o consumo de alimentos é regulado por uma região do cérebro, a qual está relacionada a mecanismos hedônicos que estimulam o animal a ingerir alimentos mesmo na ausência de fome⁽²⁾. Neste estudo observamos que os animais submetidos a HSD tiveram maior ingestão alimentar que os animais submetidos a STD, provavelmente, devido ao fato de a HSD ser uma dieta com maior palatabilidade e, como demonstrado por King⁽⁷⁹⁾ alterar o padrão alimentar dos indivíduos, resultando em maior consumo alimentar⁽⁷⁹⁾. Ainda, foi observado que a ingestão alimentar e energética elevou após os 90 dias de idade e foram associados a baixa eficiência alimentar, resultado semelhante ao observado neste estudo⁽⁸⁰⁾.

Em relação ao CEA, encontramos uma redução de ~9% do grupo HSD-NC em relação ao grupo STD-NC. Ademais, Roberts e cols.⁽⁸¹⁾ relataram que os ratos que consumiram uma dieta rica em gordura e carboidratos refinados apresentaram menor eficiência alimentar, possivelmente explicada pela baixa metabolização energética observada em dietas composta por alta concentração de gordura e carboidratos refinados, tornando necessária uma maior ingestão alimentar para suprir as necessidades energéticas dos animais^(81,82). Em virtude disso, as dietas com essa característica apresentam maior concentração de resíduos, o qual eleva a atividade do trato gastrointestinal e, conseqüentemente, o gasto energético⁽⁸¹⁾.

Com relação ao CGPCC foi observado efeito da dieta pós-desmame, todavia não apresentou significância no pós-teste. Este coeficiente sugere que a dieta ingerida apresenta maior eficiência em promover a elevação do peso corporal⁽⁸²⁾. No entanto, foi observado que a ingestão insuficiente de nutrientes durante o período neonatal está associada à menor eficácia alimentar⁽⁸²⁾.

4.3 Análise dos parâmetros biométricos (ganho de massa, índice de Lee e índice de adiposidade) após 8 semanas de experimento

Os parâmetros biométricos (ganho de massa corporal, índice de Lee e índice de adiposidade) estão descritos na Tabela 2, a seguir. Além do mais, esses parâmetros foram realizados conforme descrito na seção Materiais e Métodos.

Tabela 2 – Efeito do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o ganho de massa corporal, índice de Lee e índice de adiposidade após 8 semanas de experimento.

	Ninhada controle		Ninhada reduzida		p-valor		
	STD-NC	HSD-NC	STD-NR	HSD-NR	Efeito do tamanho da ninhada	Efeito da dieta pós-desmame	Interação
Ganho de massa(g)	304,3±23,3	294,9±12,5	297,7±18,1	298±15,1	0,7993	0,5113	0,4813
IL	30,65±1,77	30,83±1,95	30,26±1,99	30,00±0,34	0,3536	0,9474	0,7329
IA	3,46(2,9-3,6)	4,18(4,13-5,98)*	3,23(2,78-4,14)	3,62(3,16-4,26)	0,1275	0,0076	0,7159

Os dados paramétricos estão representados como média±SD e os dados não paramétricos como mediana e IQR. Os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram avaliados por ANOVA TWO-WAY, seguidos de pós-teste Bonferroni. *p<0,05. IL, índice de Lee; IA, índice de adiposidade; STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples; NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida.

Fonte: Elaboração própria.

Conforme o descrito na Tabela 3, o ganho de massa e o índice de Lee não apresentaram diferenças, enquanto o índice de adiposidade evidenciou efeito da dieta pós-desmame (p<0,01), aumentando 20,8% do grupo HSD-NC em relação ao grupo STD-NC.

Dados anteriores do nosso grupo corroboram o encontrado no presente estudo, uma vez que também não observaram diferenças no peso corporal e no índice de Lee dos animais após a ingestão da HSD ^(19,20,22). Vale destacar que as diferenças no IL foram observadas apenas após 12 semanas de consumo da HSD, conforme o previamente publicado pelo grupo ⁽²⁰⁾. Além do mais, outros resultados semelhantes são apresentados, os quais demonstram que os ratos alimentados com dieta isocalórica com alta concentração de açúcar simples não indicam divergência da massa corporal entre os grupos em diferentes semanas ^(76,78,79).

A elevação do índice de adiposidade em animais submetidos a HSD pode ser explicada através da via da lipogênese *de novo*, uma vez que esta via é responsável por produzir TAG através de substratos provenientes da dieta como a glicose ^(60,78). Ademais, quando há um

quadro de hiperglicemia, o excesso de glicose é oxidada formando piruvato^(79,80). Ainda, o excesso de energia produzido promove um acúmulo dos intermediários da via, e o citrato acumulado extravasa para o citosol, neste momento ocorre a conversão de citrato em oxalacetato e acetil-Coa pela ação da enzima citrato liase^(60,66,80). Posteriormente, a enzima acetil-Coa carboxilase atua convertendo acetil-Coa em malonil-Coa, o qual atua na produção de ácido graxos^(80,81).

Ainda, os roedores quando criados em ninhadas reduzidas apresentam um ganho de peso acelerado que promove alterações metabólicas durante a fase adulta. Estas alterações são esperadas neste modelo experimental, uma vez que são utilizados para avaliar as modificações metabólicas que ocorrem em humanos a longo prazo, porém de uma forma mais rápida^(7,27,29). Ainda, esta elevação do peso está associada à RI, redução da tolerância à glicose e a EH^(68,78,79). Vale destacar que a literatura relata que animais provenientes de ninhadas reduzidas apresentam elevação do apetite, aumento da massa corporal e tecido adiposo⁽⁷⁾. Esses animais submetidos a alteração artificial do tamanho da ninhada manifestam hipoplasia e hipotrofia do Hipotálamo Ventro-Medial (VMH), estrutura que atua na regulação da homeostase energética e encontra-se suscetível às modificações epigenéticas promovidas nos períodos críticos do desenvolvimento, visto que se trata de uma região susceptível à estas alterações, pois se encontra em desenvolvimento^(84,85). Salienta-se ainda que as interferências no sistema nervoso central, podem resultar em hiperfagia^(62,80).

Embora não tenhamos encontrado alterações na massa corporal, o nosso trabalho é corroborado por estes dados, visto que os grupos submetidos a HSD apresentaram uma maior ingestão alimentar associada a elevação do índice de adiposidade, sugerindo que este maior consumo alimentar resultou em uma alteração da composição corporal sem modificar a massa total⁽⁹²⁾.

Outro mecanismo plausível para explicar este aumento da ingestão alimentar e do IA observados no grupo HSD-NC seria uma ação da leptina, hormônio relacionado a homeostase energética responsável por controlar a ingestão alimentar através da sinalização ao hipotálamo, promovendo a hiperfagia observada⁽²⁹⁾. Essa hipótese é bastante atrativa, uma vez que dados anteriores do nosso grupo demonstraram que os animais submetidos a HSD apresentam elevados níveis de leptina, mas sem alterações na ingestão alimentar, sugerindo uma resistência ao hormônio⁽²¹⁾. Ainda, a resistência a leptina ocorre devido a modificações na sinalização intracelular promovida através da ligação da leptina ao receptor ou em

decorrência da redução do transporte da leptina através da barreira hematoencefálica ⁽⁸⁷⁾. Ademais, este resultado é endossado por Heuvel e cols. ⁽⁸⁸⁾, no qual demonstraram que a ingestão de açúcar e gordura suprime a sinalização deste hormônio, promovendo o aumento da ingestão alimentar ⁽⁸⁸⁾.

4.4 Análise do perfil lipídico sérico (TAG e colesterol total) após 8 semanas de experimento.

Na tabela 3 estão descritos os resultados referentes ao perfil lipídico séricos dos animais (COL e TAG séricos). A análise do perfil lipídico sérico foi efetivada em conformidade com o descrito na seção Materiais e Métodos.

Tabela 3 – Efeito do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o colesterol total e o TAG séricos após 8 semanas de experimento.

	Ninhada controle		Ninhada reduzida		p-valor		
	STD-NC	HSD-NC	STD-NR	HSD-NR	Efeito do tamanho da ninhada	Efeito da dieta pós-desmame	Interação
COL (mg/dL)	54,8±7,7	57,8±9,1	63,2±5,9	63,0±6,3	0,0282	0,6233	0,6005
TAG (mg/dL)	76,2±9,4	162,3±13,9*	116,3±9,8 [§]	142,4±18,9*	0,0155	<0,001	<0,001

Os dados paramétricos estão representados como média ± SD. Os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram avaliados por ANOVA TWO-WAY, seguidos de pós-teste Bonferroni. [§]p<0,05 em relação à STD; *p< 0,05 em relação à NC. *p<0,05. STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples; NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; COL, colesterol total; TAG, triglicerídeos.

Fonte: Elaboração própria.

De acordo com o descrito na Tabela 3, o colesterol total sérico demonstrou efeito do tamanho da ninhada (p<0,05), no entanto, o pós-teste não apresentou significância estatística. O estudo desenvolvido por Rinald e cols. ⁽⁷⁸⁾ demonstrou que os animais criados em ninhadas reduzidas apresentaram um aumento da concentração de colesterol total, sendo que a fração HDL-colesterol reduziu durante as 13 semanas de experimento, sugerindo que a alteração nas frações do colesterol resultou no aumento do colesterol total ⁽⁷⁸⁾. Embora não tenhamos dosado as frações HDL e LDL do colesterol, esta possibilidade é bastante atrativa para nos auxiliar a compreender as alterações observadas nas concentrações de colesterol da ninhada reduzida, sugerindo a realização de experimentos futuros para confirmar essa hipótese.

O TAG sérico evidenciou efeito do tamanho da ninhada (p<0,05), aumentando ~52,6% do grupo STD-NR em relação ao STD-NC, da dieta pós-desmame (p<0,001), aumentando ~113% da concentração de TAG do grupo HSD-NC em relação ao STD-NC e apontou efeito

da interação ($p < 0,001$), elevando ~22,4% do grupo HSD-NR em relação ao STD-NR. Em relação às concentrações de TAG séricos, Rinaldi e cols. ⁽⁷⁸⁾ demonstraram uma elevação de ~29% na concentração de TAG no grupo ninhada reduzida (NR), em relação a ninhada padrão (NN). O resultado anteriormente citado valida o encontrado no presente estudo, uma vez que os animais da NR apresentaram maiores concentrações de TAG em relação ao grupo NN ⁽⁷⁸⁾. Ainda, dados prévios do nosso grupo demonstraram que a HSD elevou a concentração de TAG após 8 semanas de consumo ⁽²⁰⁾. Ademais, com o consumo em excesso de dieta rica em carboidratos simples há uma estimulação elevada da produção hepática de TAG a partir da via de lipogênese de novo (DNL), promovendo aumento da concentração de VLDL e, consequente, liberação de lipoproteína de muito baixa densidade ^(60,88,96,97). Ainda, o efeito da interação no TAG sérico demonstrou uma elevação menor quando comparado aos outros grupos. E esse achado é bastante interessante, uma vez que sugerimos um efeito protetor associado a interação das variáveis (redução da ninhada e HSD).

4.5 Avaliação dos parâmetros glicometabólicos dos animais após 8 semanas de experimento

Os parâmetros glicometabólicos foram realizados de acordo com o descrito na seção Materiais e Métodos. Na Tabela 5 estão descritos os resultados referentes a glicose (mmol/L) e ao teste de tolerância à glicose (TTG).

Tabela 4 – Efeito do tamanho da manipulação da ninhada e da dieta pós-desmame sobre os parâmetros glicometabólicos dos animais após 8 semanas de experimento.

	Ninhada controle		Ninhada reduzida		p-valor		
	STD-NC	HSD-NC	STD-NR	HSD-NR	Efeito do tamanho da ninhada	Efeito da dieta pós-desmame	Interação
Glicose (mmol/ L)	9,17±1,03	8,09±0,54	7,79±1,35	8,61±0,92	0,2857	0,7487	0,0268
TTG (AUC)	907±86,3	1014±110,2	950,8±64,2	1047±104,1	0,3281	0,0174	0,8871

Os dados paramétricos estão representados como média±SD. Os efeitos da manipulação do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram avaliados por ANOVA TWO-WAY, seguidos de pós-teste Bonferroni. * $p < 0,05$. STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples; NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida.

Fonte: Elaboração própria.

Conforme o descrito na Tabela 4, a glicose apresentou efeito da interação ($p < 0,05$) e o TTG (AUC) apresentou efeito da dieta pós-desmame ($p < 0,05$), porém, ambos não apresentaram

significância estatística no pós-teste. De acordo com a literatura, os animais submetidos a HSD apresentam intolerância à glicose, aumento da concentração da insulina, resistência à insulina (RI), e consequente, aumento da função das células β -pancreáticas, apesar de não demonstrarem significância estatística ^(7,29).

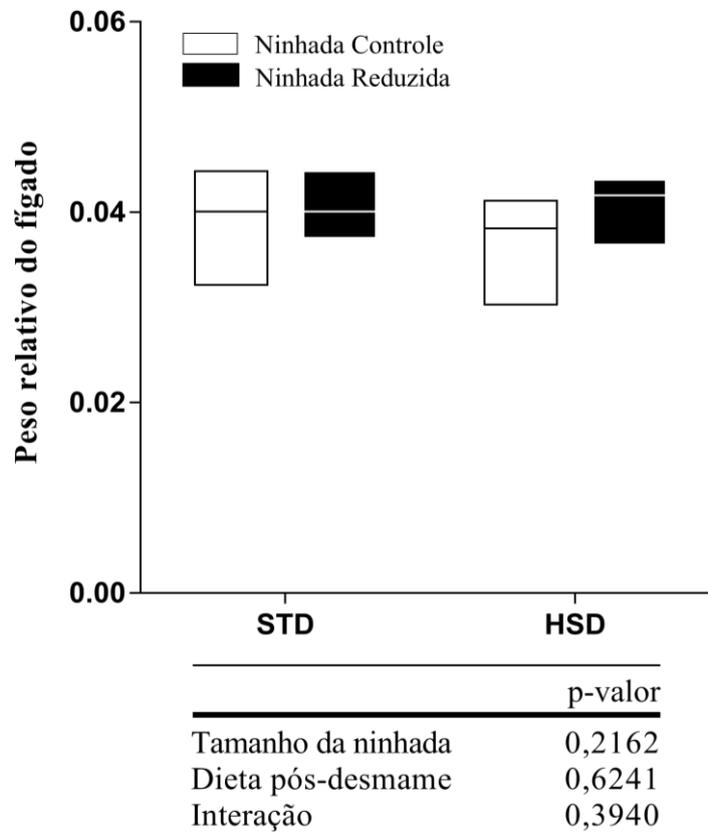
Apesar de não termos demonstrado diferenças no pós-teste, a área sob a curva (AUC) no teste de tolerância à glicose (TTG) foi influenciada pela dieta pós-desmame, sugerindo um quadro de intolerância à glicose. De Oliveira e cols. ⁽⁹⁸⁾ demonstraram que a HSD elevou a AUC, induzindo a intolerância à glicose. Em resposta a essa elevação a atividade das células β -pancreáticas aumentou, evidenciando o aumento do hormônio insulina no período do experimento. A necessidade elevada da insulina para promover o controle da glicemia, pode danificar o funcionamento normal das células pancreáticas, contribuindo para o surgimento de diabetes tipo 2 ⁽⁹⁸⁾. Ademais, dados prévios do nosso grupo demonstraram que a AUC apresentou efeito da HSD, sugerindo uma alteração a tolerância à glicose ⁽²²⁾. Apesar de não termos dosado as concentrações de insulina neste momento, este experimento é essencial para avaliarmos a indução da RI no nosso modelo, visto que é uma alteração esperada decorrente do consumo da dieta com elevado conteúdo de carboidratos simples ⁽⁸⁹⁾.

A literatura aponta que animais criados em ninhadas reduzidas têm maior acesso ao leite materno, e por isso, ingerem maiores quantidades quanto comparados a roedores criados em ninhadas controle ^(7,27). Ainda, este modelo experimental está sujeito a desenvolver hiperfagia, aumento da gordura corporal, hiperleptinemia, hiperglicemia e elevação da concentração de insulina no período pós-natal imediato que persiste até a idade adulta ^(7,27).

4.6 Avaliação das análises realizadas no fígado: peso relativo, grau de esteatose, teor de lipídeos totais, COL e TAG hepáticos.

Na Figura 4 está descrito o resultado referente ao peso relativo do fígado após 8 semanas de experimento. O tecido foi retirado e pesado para posteriores análises como descrito na seção Materiais e Métodos.

Figura 4 – Determinação dos efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o peso relativo do fígado após 8 semanas de experimento.

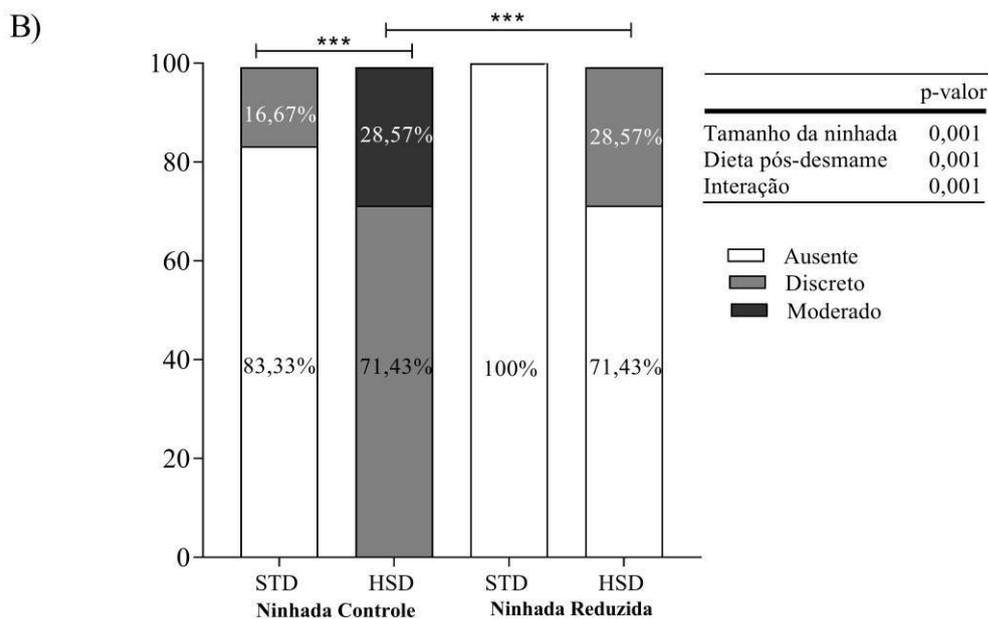
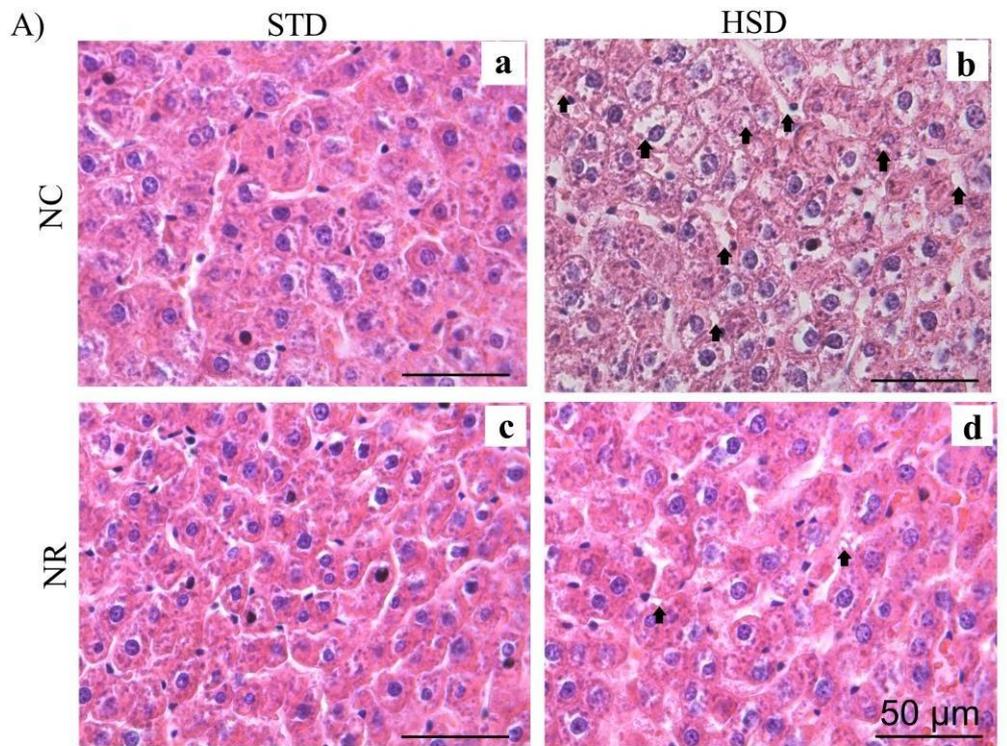


A manipulação da ninhada foi realizada como previamente publicado, na qual a NC era integrada por oito filhotes por mãe e NR por quatro filhotes por mãe. O peso relativo do fígado foi calculado a partir da seguinte fórmula: [peso do fígado (g)/ massa corporal dos animais (g)]. Os efeitos da alteração do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram avaliados através da ANOVA TWO-WAY, seguidos de pós-teste Bonferroni. Os dados não paramétricos foram representados como mediana e IQR. STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

A respeito do peso relativo do fígado, não observamos efeitos das variáveis tamanho da ninhada e dieta pós-desmame. Embora a literatura relate que a redução tamanho da ninhada promova a elevação do peso do fígado do animal ^(7,29,78), este resultado não foi encontrado no presente estudo. Na Figura 5 está descrito o resultado do grau de esteatose; esta análise foi realizada conforme o descrito na seção Materiais e Métodos.

Figura 5 – Grau de esteatose hepática dos animais submetidos aos efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame após 8 semanas de experimento.



Análise histológica do fígado dos animais após 8 semanas de experimento. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE). No quadrante **A** estão localizadas as fotografias das lâminas histológicas: a) STD-NC; b) HSD-NC; c) STD-NR e d) HSD-NR. As fotos foram capturas com o auxílio de um Microscópio Óptico Digital Leica DM500B, utilizando a objetiva de 40×. Barra = 50 µm. As setas pretas representam as gotículas lipídicas. O quadrante **B** descreve a classificação de esteatose dos grupos, o qual foi realizado através da análise de contingência. A manipulação da ninhada foi realizada como previamente publicado⁽¹⁾, na qual a NC era composta por 8 filhotes/mãe e a NR por 4filhotes/mãe. Os efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram avaliados através do ANOVA TWO-WAY, seguidos de pós-teste Bonferroni. Os dados

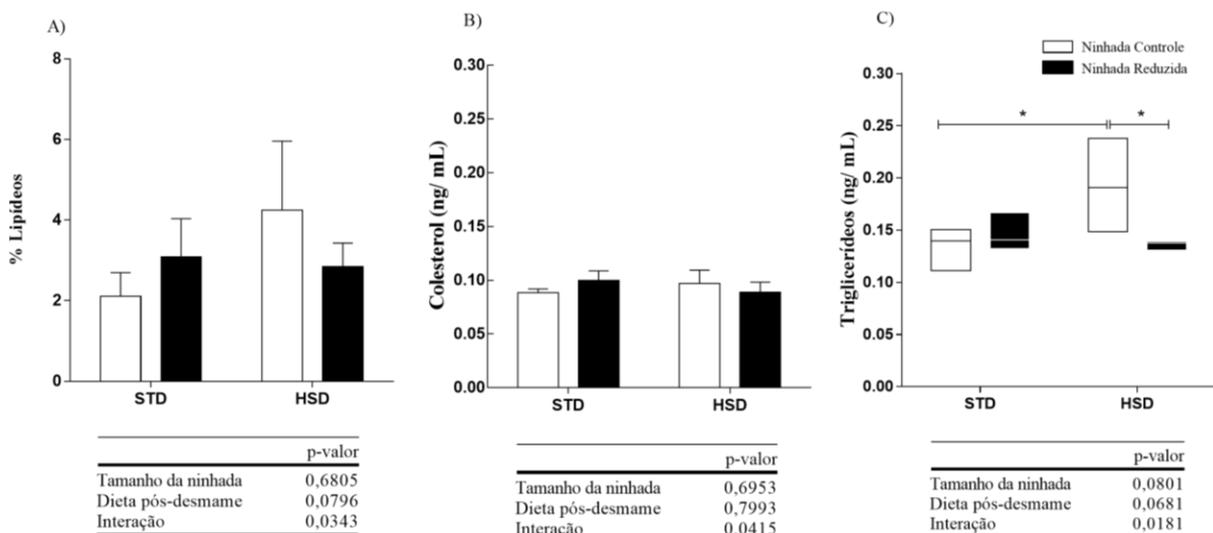
paramétricos foram representados como média \pm SD. STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples. *** $p < 0,001$.

Fonte: Elaboração própria.

Conforme o exposto na Figura 5, no quadrante B, observamos efeito do tamanho da ninhada, da dieta pós-desmame e da interação ($p < 0,001$) no grau de esteatose dos animais. Nos animais HSD-NC observamos um aumento ~ 20 vezes do grau de esteatose discreto, evidenciando o comprometimento de 71,43% dos hepatócitos destes animais quando comparados ao STD-NC, os quais apresentaram 16,67% dos hepatócitos com grau de esteatose discreto. Além disso, o grupo HSD-NC também apresentou 28,57% dos hepatócitos com grau de esteatose moderado. Em contrapartida, observamos que o efeito da interação promoveu uma redução de ~ 12 vezes o grau de esteatose discreto, no qual os animais HSD-NR apresentaram 28,57% do grau de esteatose discreto com ausência do grau de esteatose moderado. Ainda, o grupo STD-NR não apresentou nenhum comprometimento dos hepatócitos. Os resultados apresentados anteriormente serão discutidos em breve, conjuntamente com os resultados sobre o perfil lipídico do fígado após a Figura 6.

Na Figura 6 a seguir estão representados os resultados a respeito do teor de lipídeos totais, COL total e TAG hepáticos, analisados conforme o descrito na seção Materiais e Métodos.

Figura 6 – Efeitos do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame sobre o teor de lipídeos hepáticos dos animais após 8 semanas de experimento.



A manipulação da ninhada foi realizada como previamente publicado⁽¹⁾, na qual a NC era integrada por oito filhotes por mãe e NR por quatro filhotes por mãe. A) Teor de Lipídeos totais; B) COL hepático; C) TAG hepático. Os efeitos da alteração do tamanho da ninhada e da dieta pós-desmame foram avaliados através da ANOVA TWO-WAY, seguidos de pós-teste Bonferroni. Os dados paramétricos foram representados como média \pm SD e os dados não paramétricos foram representados como mediana e IQR. STD, dieta padrão; HSD, dieta rica em carboidratos simples; NC, ninhada controle; NR, ninhada reduzida; ng/mL, nanograma por mililitro. * $p < 0,05$.

Fonte: Elaboração própria.

Na figura 6, gráfico A e B, observamos que tanto o teor de lipídeos quanto as concentrações do COL total hepáticos apresentaram efeitos da interação da interação ($p < 0,05$), todavia, sem efeito no pós-teste. Em relação ao TAG hepático, no gráfico C, observamos que o TAG hepático evidenciou efeito da interação ($p < 0,05$), demonstrando um aumento de ~7% do TAG hepático do grupo HSD-NC em relação ao STD e uma redução de ~12,5% na concentração de TAG nos hepatócitos dos animais do grupo HSD-NR em relação ao HSD-NC.

Diante do exposto, observamos que, apesar do peso relativo do fígado não ter apresentado diferenças entre os grupos (Figura 4), nossos resultados, demonstraram que houve alteração na composição do órgão. Para contextualizar, a EH é definida como o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos, e a RI e a hiperinsulinemia são fatores que atuam contribuindo com a deposição lipídicas nestas células ^(7,90). Ainda, a deposição lipídica aumenta a β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e também produz corpos cetônicos, contribuindo para a peroxidação lipídica e acúmulo de espécies reativas de oxigênio ^(7,90).

Os animais submetidos a HSD demonstraram elevação da concentração de TAG nos hepatócitos ⁽⁹⁹⁾. Ademais, uma pesquisa desenvolvida por Lima e cols. ⁽⁹⁰⁾ demonstrou que os animais que ingeriram uma dieta rica em açúcar simples apresentaram elevação do grau de esteatose em relação ao animais que consumiram a dieta padrão ⁽⁹⁰⁾. Outrossim, os dados apresentados endossam o encontrado no presente estudo, uma vez que observamos aumento do grau de esteatose nos animais do grupo HSD-NC em relação ao STD-NC (Figura 5B), e também aumento da concentração de TAG hepáticos no mesmo grupo (Figura 6C). Isto sugere que o excesso de carboidratos simples da dieta acentua a ativação da via da lipogênese *de novo*, contribuindo com a produção excessiva, e conseqüentemente, deposição de lipídeos nos hepatócitos ⁽⁶³⁾.

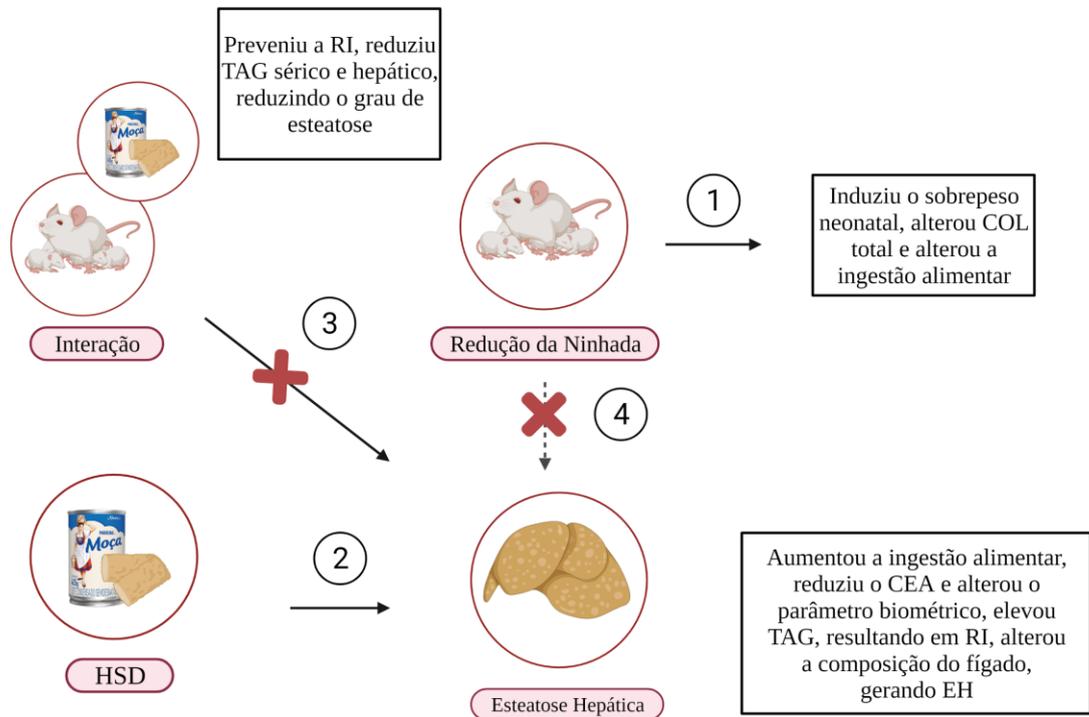
Surpreendentemente, observamos que o grupo HSD-NR apresentou uma redução do grau de esteatose discreto e ausência do moderado (Figura 5B), bem como foi observado uma redução na concentração de TAG hepático neste grupo (Figura 6C). Existem evidências científicas de que o leite materno possui altas concentrações de ácido palmítico na posição sn-2 do TAG ^(51,104). Este atua regulando o metabolismo energético e lipídico, regulando as concentrações de N-aciletanolamina e do receptor ativado por proliferadores de peroxissoma alfa (PPAR- α) ^(51,104). Ademais, a ativação do PPAR- α promove efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes devido ao aumento da oxidação peroxissômica e mitocondrial ^(51,104). Uma possível explicação para os nossos achados pode ser baseada na evidência de que a ingestão do leite materno melhora perfil inflamatório no fígado, aumentando a capacidade de oxidação das mitocôndrias, promovendo uma maior oxidação lipídica, resultando na redução da deposição

de lipídeos nos hepatócitos ^(51,104). Assim, considerando que a redução da ninhada resulta em maior lactação dos animais, podemos sugerir que os efeitos deletérios da HSD sobre o desenvolvimento da EH foram contidos pela programação metabólica. Além disso, o acúmulo de lipídeos nos hepatócitos eleva a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), uma vez que ocorre o aumento da β -oxidação mitocondrial de ácidos graxos e da cetogênese que geram ROS ⁽²¹⁾. Ademais, a ingestão excessiva de dietas ricas em carboidratos simples, resultam no aumento das concentrações de TAG hepático, reduzindo as concentrações de enzimas antioxidantes como a superóxido desmutase (SOD) e a catalase (CAT) ^(21,26). Com isso, o efeito protetor observado neste trabalho pode ser explicado através da programação metabólica promovida pela lactação ^(51,104). A lactação pode reduzir a produção de ROS, visto que no leite há concentrações elevadas de substâncias anti-inflamatórias, como o N-aciletanolamina e o PPAR- α que reduzem a deposição de lipídeos hepáticos, promovendo uma melhora do perfil inflamatório do fígado, resultando em um melhor funcionamento das mitocôndrias hepáticas ^(51,104). No entanto, futuros experimento são necessários para comprovar a nossa hipótese.

Uma das limitações do nosso estudo foi ausência do esclarecimento com relação ao mecanismo por trás do efeito protetor, visto que não dosamos a atividade das enzimas antioxidantes que poderiam nos auxiliar na compreensão dos efeitos da lactação sobre a redução de ROS hepático a partir da regulação do PPAR- α ⁽⁵¹⁾. Além do mais, não avaliamos as frações do colesterol sérico, sendo esse um ponto importante a ser analisado, uma vez que a observamos efeitos da redução da ninhada neste componente. Portanto, como perspectiva, seria interessante dosar as frações do colesterol (LDL e HDL) para avaliar qual a concentração desses componentes nos animais, uma vez que a redução da ninhada pode elevar as concentrações de HDL-c, conforme demonstrado por Rinaldi e cols. ⁽⁸²⁾. Ainda, pretendemos analisar os marcadores do estresse oxidativo como as enzimas SOD, CAT e proteínas carboniladas, a fim de avaliar os efeitos da interação entre as variáveis em relação ao perfil oxidativo do fígado, para, assim, avaliar se há melhora dos marcadores de estresse oxidativo nos animais após 8 semanas induzidos pela programação metabólica.

Em suma, os principais resultados obtidos através da realização desta pesquisa estão representados na figura resumo (Figura 7), a seguir:

Figura 7 – Efeito da programação metabólica induzida pela redução da ninhada e HSD sobre o desenvolvimento da EH após 8 semanas de consumo.



A redução da ninhada provoca (1) induziu o sobrepeso neonatal dos animais e também alterou o COL total. Ainda, a HSD (2) resultou no aumento da ingestão alimentar, reduziu o CEA, alterou os parâmetros biométricos, aumentou o TAG, gerando RI e alterou a composição do fígado, resultando em EH, resultando no desenvolvimento de EH. A interação entre as duas variáveis (3) resultou na redução do grau de esteatose discreto e moderado. Um possível mecanismo para essa proteção está relacionado ao estresse oxidativo, o qual pode ser atenuado pela redução da ninhada (lactação) (4). Entretanto, essa hipótese precisa ser confirmada. CEA, coeficiente de eficiência alimentar; EH, esteatose hepática; HSD, dieta pós-desmame.

Fonte: Elaboração própria. BioRender, 2021. Disponível em: <https://biorender.com/>. Acesso em: 01 de julho de 2021.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- I. A redução do tamanho da ninhada resultou em sobrepeso neonatal, alterou o perfil lipídico sérico e a ingestão alimentar;
- II. A HSD aumentou a ingestão alimentar, reduziu o CEA, modificou os parâmetros biométricos, glicometabólicos e o perfil lipídico sérico, resultando em RI, bem como alterou a composição do fígado, promovendo o desenvolvimento da EH;
- III. A interação entre as variáveis preveniu o desenvolvimento da RI causada pela HSD, bem como reduziu a concentração de TAG séricos e hepáticos, resultando numa redução do grau de esteatose dos animais.

A partir da realização deste trabalho concluímos que a programação metabólica induzida pela redução do tamanho da ninhada, promoveu efeitos protetores em relação ao desenvolvimento da EH induzida por HSD após 8 semanas de experimento. Entretanto, futuros experimentos são necessários para corroborar a nossa hipótese, uma vez que os mecanismos responsáveis pelo efeito protetor ainda não estão completamente esclarecidos.

6. REFERÊNCIAS

- [1] Spencer SJ, Tilbrook A. Neonatal overfeeding alters adult anxiety and stress responsiveness. <https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2009.02.013>.
- [2] Jiménez-Chillarón JC, Díaz R, Martínez D, Pentinat T, Ramón-Krauel M, Ribó S, et al. The role of nutrition on epigenetic modifications and their implications on health. *Biochimie* 2012;94:2242–63. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2012.06.012>.
- [3] Cannon M V., Pilarowski G, Liu X, Serre D. Extensive epigenetic changes accompany terminal differentiation of mouse hepatocytes after birth. *G3 Genes, Genomes, Genet* 2016;6:3701–9. <https://doi.org/10.1534/g3.116.034785>.
- [4] Reizel Y, Sabag O, Skversky Y, Spiro A, Steinberg B, Bernstein D, et al. Postnatal DNA demethylation and its role in tissue maturation. *Nat Commun* 2018;9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04456-6>.
- [5] Parra-Vargas M, Ramon-Krauel M, Lerin C, Jimenez-Chillaron JC. Size Does Matter: Litter Size Strongly Determines Adult Metabolism in Rodents. *Cell Metab* 2020;32:334–40. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.07.014>.
- [6] Preston JD, Reynolds LJ, Pearson KJ. Developmental Origins of Health Span and Life Span: A Mini-Review. *Gerontology* 2018;64:237–45. <https://doi.org/10.1159/000485506>.
- [7] Ramon-Krauel M, Pentinat T, Bloks VW, Cebrià J, Ribo S, Pérez-Wienese R, et al. Epigenetic programming at the *Mogat1* locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance. *FASEB J* 2018;32:6025–37. <https://doi.org/10.1096/fj.201700717RR>.
- [8] Brands B, Demmelmair H, Koletzko B. How growth due to infant nutrition influences obesity and later disease risk. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2014;103:578–85. <https://doi.org/10.1111/apa.12593>.
- [9] Tavares LF, Fonseca SC, Garcia Rosa ML, Yokoo EM. Relationship between ultra-processed foods and metabolic syndrome in adolescents from a Brazilian Family Doctor Program. *Public Health Nutr* 2012;15:82–7. <https://doi.org/10.1017/S1368980011001571>.

- [10] Poti JM, Braga B, Qin B. Ultra-processed Food Intake and Obesity: What Really Matters for Health-Processing or Nutrient Content? *Curr Obes Rep* 2017;6:420–31. <https://doi.org/10.1007/s13679-017-0285-4>.
- [11] Softic S, Gupta MK, Wang GX, Fujisaka S, O'Neill BT, Rao TN, et al. Divergent effects of glucose and fructose on hepatic lipogenesis and insulin signaling. *J Clin Invest* 2017;127:4059–74. <https://doi.org/10.1172/JCI94585>.
- [12] Softic S, Meyer JG, Wang GX, Gupta MK, Batista TM, Lauritzen HPMM, et al. Dietary Sugars Alter Hepatic Fatty Acid Oxidation via Transcriptional and Post-translational Modifications of Mitochondrial Proteins. *Cell Metab* 2019;30:735-753.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2019.09.003>.
- [13] Eslamparast T, Tandon P, Raman M. Dietary composition independent of weight loss in the management of non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrients* 2017;9. <https://doi.org/10.3390/nu9080800>.
- [14] Conceição EPS, Franco JG, Oliveira E, Resende AC, Amaral TAS, Peixoto-Silva N, et al. Oxidative stress programming in a rat model of postnatal early overnutrition - role of insulin resistance. *J Nutr Biochem* 2013;24:81–7. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2012.02.010>.
- [15] Owen CG, Whincup PH, Cook DG. Symposium II: Infant and childhood nutrition and disease: Breast-feeding and cardiovascular risk factors and outcomes in later life: Evidence from epidemiological studies. *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 70, *Proc Nutr Soc*; 2011, p. 478–84. <https://doi.org/10.1017/S0029665111000590>.
- [16] Alderete TL, Autran C, Brekke BE, Knight R, Bode L, Goran MI, et al. Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. *Am J Clin Nutr* 2015;102:1381–8. <https://doi.org/10.3945/ajcn.115.115451>.
- [17] Gridneva Z, Rea A, Tie WJ, Lai CT, Kugananthan S, Ward LC, et al. Carbohydrates in human milk and body composition of term infants during the first 12 months of lactation. *Nutrients* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11071472>.
- [18] De Oliveira DT, Fernandes I da C, de Sousa GG, Dos Santos TAP, de Paiva NCN, Carneiro CM, et al. High-sugar diet leads to obesity and metabolic diseases in ad libitum-fed rats irrespective of caloric intake. *Arch Endocrinol Metab* 2020;64:71–81. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000199>.

- [19] Lima MLRP, Leite LHR, Gioda CR, Leme FOP, Couto CA, Coimbra CC, et al. A novel wistar rat model of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease induced by sucrose-rich diet. *J Diabetes Res* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9127076>.
- [20] Marousez L, Lesage J, Eberlé D. Epigenetics: Linking early postnatal nutrition to obesity programming? *Nutrients* 2019;11. <https://doi.org/10.3390/nu11122966>.
- [21] Lima MLRP, Leite LHR, Gioda CR, Leme FOP, Couto CA, Coimbra CC, et al. A novel wistar rat model of obesity-related nonalcoholic fatty liver disease induced by sucrose-rich diet. *J Diabetes Res* 2016;2016. <https://doi.org/10.1155/2016/9127076>.
- [22] Dunsworth HM, Warrener AG, Deacon T, Ellison PT, Pontzer H. Metabolic hypothesis for human altriciality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012;109:15212–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1205282109>.
- [23] Karina Barbosa de Queiroz. Molecular Mechanism Driving Retroperitoneal Adipocyte Hypertrophy and Hyperplasia in Response to a High-sugar Diet. *Mol Nutr Food Res* 2014;1–12. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400013>.This.
- [24] De Queiroz KB, Rodovalho GV, Guimarães JB, De Lima DC, Coimbra CC, Evangelista EA, et al. Endurance training blocks uncoupling protein 1 up-regulation in brown adipose tissue while increasing uncoupling protein 3 in the muscle tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Nutr Res* 2012;32:709–17. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.06.020>.
- [25] De Queiroz KB, Guimarães JB, Coimbra CC, Rodovalho GV, Carneiro CM, Evangelista EA, et al. Endurance training increases leptin expression in the retroperitoneal adipose tissue of rats fed with a high-sugar diet. *Lipids* 2013;49:85–96. <https://doi.org/10.1007/s11745-013-3854-7>.
- [26] De Queiroz KB, Honorato-Sampaio K, Júnior JVR, Leal DA, Pinto ABG, Kappes-Becker L, et al. Physical activity prevents alterations in mitochondrial ultrastructure and glucometabolic parameters in a high-sugar diet model. *PLoS One* 2017;12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172103>.
- [27] De Queiroz KB, Coimbra RS, Ferreira AR, Carneiro CM, Paiva NCN, Costa DC, et al. Molecular mechanism driving retroperitoneal adipocyte hypertrophy and hyperplasia in response to a high-sugar diet. *Mol Nutr Food Res* 2014;58:2331–4. <https://doi.org/10.1002/mnfr.201400241>

- [28] Waddington CH. The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 2012;41:10–3. <https://doi.org/10.1093/ije/dyr184>.
- [29] Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. *Cell* 2007;128:635–8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.006>.
- [30] Peixoto P, Cartron PF, Serandour AA, Hervouet E. From 1957 to nowadays: A brief history of epigenetics. *Int J Mol Sci* 2020;21:1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21207571>.
- [31] Barker DJP, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth MEJ. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *Br Med J* 1989;298:564–7. <https://doi.org/10.1136/bmj.298.6673.564>.
- [32] Ravelli G-P, Stein ZA, Susser MW. Obesity in Young Men after Famine Exposure in Utero and Early Infancy. *N Engl J Med* 1976;295:349–53. <https://doi.org/10.1056/nejm197608122950701>.
- [33] Hahn P. Effect of litter size on plasma cholesterol and insulin and some liver and adipose tissue enzymes in adult rodents. *J Nutr* 1984;114:1231–4. <https://doi.org/10.1093/jn/114.7.1231>.
- [34] Xavier JLP, Scomparin DX, Pontes CC, Ribeiro PR, Cordeiro MM, Marcondes JA, 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. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920170971>.
- [35] Dor Y, Cedar H. Principles of DNA methylation and their implications for biology and medicine. *Lancet* 2018;392:777–86. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31268-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31268-6).
- [36] Wu X, Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: Mechanism, function and beyond. *Nat Rev Genet* 2017;18:517–34. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.33>.
- [37] James P, Sajjadi S, Tomar AS, Saffari A, Fall CHD, Prentice AM, et al. Candidate genes linking maternal nutrient exposure to offspring health via DNA methylation: A review of existing evidence in humans with specific focus on one-carbon metabolism. *Int J Epidemiol* 2018;47:1910–37. <https://doi.org/10.1093/ije/dyy153>.

- [38] Skvortsova K, Iovino N, Bogdanović O. Functions and mechanisms of epigenetic inheritance in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19:774–90. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0074-2>.
- [39] Minatel BC, Martinez VD, Ng KW, Sage AP, Tokar T, Marshall EA, et al. Large-scale discovery of previously undetected microRNAs specific to human liver. *Hum Genomics* 2018;12:16. <https://doi.org/10.1186/s40246-018-0148-4>.
- [40] Chleilat F, Schick A, Deleemans JM, Reimer RA. Paternal methyl donor supplementation in rats improves fertility, physiological outcomes, gut microbial signatures and epigenetic markers altered by high fat/high sucrose diet. *Int J Mol Sci* 2021;22:1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22020689>.
- [41] Hannon E, Knox O, Sugden K, Burrage J, Wong CCY, Belsky DW, et al. Characterizing genetic and environmental influences on variable DNA methylation using monozygotic and dizygotic twins. *PLOS Genet* 2018;14:e1007544. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007544>.
- [42] Ramon-Krauel M, Pentinat T, Bloks VW, Cebrià J, Ribo S, Pérez-Wienese R, et al. Epigenetic programming at the *Mogat1* locus may link neonatal overnutrition with long-term hepatic steatosis and insulin resistance. *FASEB J* 2018;32:6025–37. <https://doi.org/10.1096/fj.201700717RR>.
- [43] Ehara T, Kamei Y, Yuan X, Takahashi M, Kanai S, Tamura E, et al. Ligand-activated PPAR α -dependent DNA demethylation regulates the fatty acid β -oxidation genes in the postnatal liver. *Diabetes* 2015;64:775–84. <https://doi.org/10.2337/db14-0158>.
- [44] Zhu S, Eclarinal J, Baker MS, Li G, Waterland RA. Developmental programming of energy balance regulation: Is physical activity more “programmable” than food intake? *Proc. Nutr. Soc.*, vol. 75, Cambridge University Press; 2016, p. 73–7. <https://doi.org/10.1017/S0029665115004127>.
- [45] Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 2009;587:4963–76. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176156>.
- [46] Plagemann A, Harder T, Brunn M, Harder A, Roepke K, Wittrock-Staar M, et al. Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early

- overfeeding: An epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. *J Physiol* 2009;587:4963–76. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.176156>.
- [47] Plagemann A, Roepke K, Harder T, Brunn M, Harder A, Wittrock-Staar M, et al. Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. *J Perinat Med* 2010;38:393–400. <https://doi.org/10.1515/JPM.2010.051>.
- [48] Koleva PT, Bridgman SL, Kozyrskyj AL. The infant gut microbiome: Evidence for obesity risk and dietary intervention. *Nutrients* 2015;7:2237–60. <https://doi.org/10.3390/nu7042237>.
- [49] Chambers ES, Preston T, Frost G, Morrison DJ. Role of Gut Microbiota-Generated Short-Chain Fatty Acids in Metabolic and Cardiovascular Health. *Curr Nutr Rep* 2018;7:198–206. <https://doi.org/10.1007/s13668-018-0248-8>.
- [50] Raychaudhuri N, Thamotharan S, Srinivasan M, Mahmood S, Patel MS, Devaskar SU. Postnatal exposure to a high-carbohydrate diet interferes epigenetically with thyroid hormone receptor induction of the adult male rat skeletal muscle glucose transporter isoform 4 expression. *J Nutr Biochem* 2014;25:1066–76. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2014.05.011>.
- [51] Trinchese G, Cavaliere G, Filippo C De, Aceto S, Prisco M, Chun JT, et al. Human milk and donkey milk, compared to cow milk, reduce inflammatory mediators and modulate glucose and lipid metabolism, acting on mitochondrial function and oleylethanolamide levels in rat skeletal muscle. *Front Physiol* 2018;9:32. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00032>.
- [52] McDaniel MR, Barker E, Lederer CL. Sensory Characterization of Human Milk. *J Dairy Sci* 1989;72:1149–58. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(89\)79218-3](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(89)79218-3).
- [53] Bembich S, Davanzo R, Brovedani P, Clarici A, Massaccesi S, Demarini S. Functional neuroimaging of breastfeeding analgesia by multichannel near-infrared spectroscopy. *Neonatology* 2013;104:255–9. <https://doi.org/10.1159/000353386>.
- [54] Nyaradi A, Li J, Foster JK, Hickling S, Jacques A, O’Sullivan TA, et al. Good-quality diet in the early years may have a positive effect on academic achievement. *Acta Paediatr Int J Paediatr* 2016;105:e209–18. <https://doi.org/10.1111/apa.13324>.
- [55] Gould JF. Complementary feeding, micronutrients and developmental outcomes of

- children. Nestle Nutr. Inst. Workshop Ser., vol. 87, S. Karger AG; 2017, p. 13–28. <https://doi.org/10.1159/000448934>.
- [56] Pérez-Escamilla R, Segura-Pérez S, Lott M. Feeding Guidelines for Infants and Young Toddlers: A Responsive Parenting Approach | Feeding Guidelines for Infants and Young Toddlers: A Responsive Parenting Approach Healthy Eating Research Building evidence to prevent childhood obesity. 2017.
- [57] Organization WH (WHO). Infant and young child nutrition: Global strategy on infant and young child feeding Report by the Secretariat. 2002.
- [58] Ken Ong, Anthony Williams, Peter Aggett, Annie S. Anderson, Robert Fraser, Alan A. Jackson, Mairead Kiely, Lucilla Poston, Ann Prentice, Monique Raats, Sian Robinson AW. Scientific Advisory Committee on Nutrition (SACN): Feeding in the First Year of Life. 2018.
- [59] Savino F, Liguori SA, Fissore MF, Oggero R. Breast Milk Hormones and Their Protective Effect on Obesity. *Int J Pediatr Endocrinol* 2009;2009:1–8. <https://doi.org/10.1155/2009/327505>.
- [60] Badillo-Suárez PA, Rodríguez-Cruz M, Nieves-Morales X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2017;22:171–91. <https://doi.org/10.1007/s10911-017-9382-y>.
- [61] Ley SH, O'Connor DL, Retnakaran R, Hamilton JK, Sermer M, Zinman B, et al. Impact of maternal metabolic abnormalities in pregnancy on human milk and subsequent infant metabolic development: Methodology and design. *BMC Public Health* 2010;10:1–10. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-590>.
- [62] Patel MS, Srinivasan M. Metabolic programming due to alterations in nutrition in the immediate postnatal period. *J. Nutr.*, vol. 140, *J Nutr*; 2010, p. 658–61. <https://doi.org/10.3945/jn.109.110155>.
- [63] Harding JE. The nutritional basis of the fetal origins of adult disease. *Int J Epidemiol* 2001;30:15–23. <https://doi.org/10.1093/ije/30.1.15>.
- [64] Coupé B, Amarger V, Grit I, Benani A, Parnet P. Nutritional programming affects hypothalamic organization and early response to leptin. *Endocrinology* 2010;151:702–

13. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0893>.
- [65] Bentham J, Di Cesare M, Bilano V, Bixby H, Zhou B, Stevens GA, 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;390:2627–42. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32129-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32129-3).
- [66] Gluckman P, Nishtar S, Armstrong T. Ending childhood obesity: A multidimensional challenge. *Lancet* 2015;385:1048–50. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60509-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60509-8).
- [67] Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of insulin action and insulin resistance. *Physiol Rev* 2018;98:2133–223. <https://doi.org/10.1152/physrev.00063.2017>.
- [68] Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol* 2019;234:8152–61. <https://doi.org/10.1002/jcp.27603>.
- [69] Titchenell PM, Lazar MA, Birnbaum MJ. Unraveling the Regulation of Hepatic Metabolism by Insulin. *Trends Endocrinol Metab* 2017;28:497–505. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.03.003>.
- [70] Chiu S, Mulligan K, Schwarz JM. Dietary carbohydrates and fatty liver disease: De novo lipogenesis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2018;21:277–82. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000469>.
- [71] Bei F, Jia J, Jia YQ, Sun JH, Liang F, Yu ZY, et al. Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. *Lipids Health Dis* 2015;14:96. <https://doi.org/10.1186/s12944-015-0094-2>.
- [72] Patel BM, Goyal RK. Liver and insulin resistance: New wine in old bottle!!! *Eur J Pharmacol* 2019;862. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.172657>.
- [73] Leavens KF, Birnbaum MJ. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2011;46:200–15. <https://doi.org/10.3109/10409238.2011.562481>.
- [74] Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, Lomonaco R, Biernacki D, Orsak B, et al. High prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus and normal plasma aminotransferase levels. *J Clin Endocrinol Metab*

- 2015;100:2231–8. <https://doi.org/10.1210/jc.2015-1966>.
- [75] Huang F, Zhu P, Wang J, Chen J, Lin W. Postnatal overfeeding induces hepatic microRNA-221 expression and impairs the PI3K/AKT pathway in adult male rats. *Pediatr Res* 2021;89:143–9. <https://doi.org/10.1038/s41390-020-0877-7>.
- [76] Lutz IA. Instituto Adolfo Lutz : Métodos físico-químicos para análise de alimentos. IV. São Paulo: 2008.
- [77] Taylor BA, Phillips SJ. Detection of obesity QTLs on mouse chromosomes 1 and 7 by selective DNA pooling. *Genomics* 1996;34:389–98. <https://doi.org/10.1006/geno.1996.0302>.
- [78] Santos SHS, Fernandes LR, Mario ÉG, Ferreira AVM, Pôrto LCJ, Alvarez-Leite JI, et al. Mas deficiency in FVB/N mice produces marked changes in lipid and glycemic metabolism. *Diabetes* 2008;57:340–7. <https://doi.org/10.2337/db07-0953>.
- [79] Brunt EM, Janney CG, Bisceglie AM Di, Neuschwander-tetri BA, Bacon BR. <1_5_12_Nonalcoholic steatohepatitis - a proposal for grading and staging the.pdf> 1999;94.
- [80] 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.
- [81] Ribas-Aulinas F, Ribo S, Parra-Vargas M, Fernández-Pérez A, Cebrià J, Guardiola-Perello M, et al. Neonatal overfeeding during lactation rapidly and permanently misaligns the hepatic circadian rhythm and programmes adult NAFLD. *Mol Metab* 2021;45. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2021.101162>.
- [82] Rinaldi W, Ribeiro TA da S, Marques AS, Fabricio GS, Tófolo LP, Gomes RM, et al. Efeito da redução de ninhada sobre as respostas autonômicas e metabólicas de ratos Wistar. *Rev Nutr* 2012;25:321–30. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732012000300002>.
- [83] Lopes GAD, Ribeiro VLB, Barbisan LF, Marchesan Rodrigues MA. Fetal developmental programming: insights from human studies and experimental models. *J Matern Neonatal Med* 2017;30:722–8. <https://doi.org/10.1080/14767058.2016.1183635>.
- [84] Glavas MM, Kirigiti MA, Xiao XQ, Enriori PJ, Fisher SK, Evans AE, et al. Early

- Overnutrition Results in Early-Onset Arcuate Leptin Resistance and Increased Sensitivity to High-Fat Diet. *Endocrinology* 2010;151:1598–610. <https://doi.org/10.1210/en.2009-1295>.
- [85] Craig D. B and BW. Influence of early nutrition on growth and adipose tissue characteristics in male and female rats. *Am Physiol Soc* 1988.
- [86] Junior MDF, Cavalcante KVN, Ferreira LA, Lopes PR, Pontes CNR, Bessa A de SM de, et al. Postnatal early overfeeding induces cardiovascular dysfunction by oxidative stress in adult male Wistar rats. *Life Sci* 2019;226:173–84. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.04.018>.
- [87] King BM. The modern obesity epidemic, ancestral hunter-gatherers, and the sensory/reward control of food intake. *Am Psychol* 2013;68:88–961. <https://doi.org/10.1037/a0030684>.
- [88] Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GMX, Rodrigues HG, Mani F, et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim* 2007;41:111–9. <https://doi.org/10.1258/00236770779399518>.
- [89] Roberts CK, Berger JJ, Barnard RJ, James Barnard R. Long-term effects of diet on leptin, energy intake, and activity in a model of diet-induced obesity. *J Appl Physiol* 2002;93:887–93. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00224.2002>.-This.
- [90] Nery C da S, Pinheiro IL, Muniz G de S, Vasconcelos DAA de, França SP de, Nascimento E do. 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. <https://doi.org/10.1590/s1517-86922011000100010>.
- [91] Pinto BAS, Melo TM, Flister KFT, França LM, Kajihara D, Tanaka LY, et al. Early and sustained exposure to high-sucrose diet triggers hippocampal ER stress in young rats. *Metab Brain Dis* 2016;31:917–27. <https://doi.org/10.1007/s11011-016-9830-1>.
- [92] Ramos VW, Batista LO, Albuquerque KT. Effects of fructose consumption on food intake and biochemical and body parameters in Wistar rats. *Rev Port Cardiol* 2017;36:937–41. <https://doi.org/10.1016/j.repc.2017.04.003>.
- [93] da Luz FQ, Hay P, Touyz S, Sainsbury A. Obesity with comorbid eating disorders:

- Associated health risks and treatment approaches. *Nutrients* 2018;10. <https://doi.org/10.3390/nu10070829>.
- [94] Nomura K, Yamanouchi T. The role of fructose-enriched diets in mechanisms of nonalcoholic fatty liver disease. *J Nutr Biochem* 2012;23:203–8. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2011.09.006>.
- [95] Softic S, Cohen DE, Kahn CR. Role of Dietary Fructose and Hepatic De Novo Lipogenesis in Fatty Liver Disease. *Dig Dis Sci* 2016;61:1282–93. <https://doi.org/10.1007/s10620-016-4054-0>.
- [96] Haubert NJBGB, Padovan GJ, Zucoloto S, Vannucchi H, Marchini JS. Experimental induction of steatosis in different tissues after the ingestion of a carbohydrate-rich diet: Effect on the liver, on the heart and on indicators of oxidation. *Arq Gastroenterol* 2010;47:388–92. <https://doi.org/10.1590/s0004-28032010000400013>.
- [97] Yang F, Dai Y, Min C, Li X. Neonatal overfeeding induced glucocorticoid overexposure accelerates hepatic lipogenesis in male rats. *Nutr Metab* 2018;15:1–10. <https://doi.org/10.1186/s12986-018-0272-0>.
- [98] Elfers C, Ralston M, Roth CL. Studies of different female rat models of hypothalamic obesity. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2011;24:131–7. <https://doi.org/10.1515/JPEM.2011.098>.
- [99] Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: Underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* 2019;12:191–8. <https://doi.org/10.2147/DMSO.S182406>.
- [100] van den Heuvel JK, Eggels L, van Rozen AJ, Luijendijk MCM, Fliers E, Kalsbeek A, et al. Neuropeptide Y and leptin sensitivity is dependent on diet composition. *J Neuroendocrinol* 2014;26:377–85. <https://doi.org/10.1111/jne.12155>.
- [101] Schubert MM, Sabapathy S, Leveritt M, Desbrow B. Acute exercise and hormones related to appetite regulation: A meta-analysis. *Sport Med* 2014;44:387–403. <https://doi.org/10.1007/s40279-013-0120-3>.
- [102] Strable M, Ntambi J. Genetic control of de novo lipogenesis. *Biochem Mol Biol* 2010;45:199–214. <https://doi.org/10.3109/10409231003667500.Genetic>.
- [103] Oliveira DT De, Sousa GG De. High-sugar diet leads to obesity and metabolic diseases

in ad libitum-fed rats irrespective of caloric intake n.d. <https://doi.org/10.20945/2359-3997000000199>.

- [104] Trinchese G, Cavaliere G, Canani RB, Matamoros S, Bergamo P, De Filippo C, et al. Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by modulating mitochondrial function and gut microbiota. *J Nutr Biochem* 2015;26:1136–46. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.003>.

7. ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado de aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).



Comissão de Ética 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 (ID 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 Heterogenic rats (60 males), protocol number CEUA 2245040518 (ID 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		
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo: Machos	idade: 21 a 28 dias N: 60
Linhagem:	Wistar		Peso: 45 a 55 g

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 – Trabalho apresentado no Encontro de Saberes, Minas Gerais-Brasil, 2019.



2019

encontro de
saberes

Universidade Federal de Ouro Preto

50
UFOP



Certificamos que EDUARDA DOS SANTOS 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: Imprinting Metabólico e overfeeding neonatal: Efeitos da Dieta Rica em Carboidratos Simples sobre a Doença Hepática Gordurosa não Alcoólica e o estresse oxidativo em ratos Wistar jovens., de autoria de: EDUARDA DOS SANTOS, DANIEL MUNIZ OKUSHIMA ALVES, Isabela Jesus de Deus, Thaís Araújo Barud, Miliane Martins de Andrade Fagundes, Cláudia Martins Carneiro, Daniela Caldeira Costa, ERIKA CRISTINA DA SILVA OLIVEIRA SIQUEIRA, MELINA OLIVEIRA DE SOUZA, KARINA BARBOSA DE QUEIROZ.

Ouro Preto, 07 de novembro de 2019

Autenticidade



Código: 15730678005dc31b50678de

Almeida Kautsky
Prof. Mestra Parvati Dorelli G. Kautsky
Pro-reitor de Extensão

Thaís Araújo Barud
Prof. Dra. Thaís Araújo Barud
Pro-reitora de Graduação

Daniela Caldeira Costa
Prof. Dra. Daniela Caldeira Costa
Pro-fetora Adjunta de Pesquisa e Pós-Graduação

Esta certificação foi gerada automaticamente e sua autenticidade poderá ser verificada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/enfinesdes

ANEXO 3 – Trabalho apresentado no Encontro de Saberes, Minas Gerais-Brasil, 2020.



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto

UFOP

CERTIFICADO

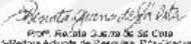
Certificamos que o trabalho **MANIPULAÇÃO DO TAMANHO DA NINHADA E RESISTÊNCIA À INSULINA: EFEITOS DA PROGRAMAÇÃO METABÓLICA SOBRE O DESENVOLVIMENTO DA ESTEATOSE HEPÁTICA EM RATOS JOVENS**, de autoria de EDUARDA DOS SANTOS, DANIEL MUNIZ OKUSHIMA ALVES, ISABELA JESUS DE DEUS, THAÍS ARAÚJO BARUD, MILIANE MARTINS DE ANDRADE FAGUNDES, CLÁUDIA MARTINS CARNEIRO, ÉRIKA CRISTINA DA SILVA SIQUEIRA, DANIELA CALDEIRA COSTA, MELINA OLIVEIRA DE SOUZA e KARINA BARBOSA DE QUEIROZ, foi apresentado no XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, realizado de 30 de Novembro a 04 de Dezembro de 2020.

Ouro Preto, 04 de Dezembro de 2020.

Autenticidade



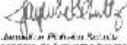
Código: 18083149585fdd04c3894d


 Prof. Ricardo Guerra de Sá Costa
 Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa, Pós-graduação e Inovação


 Prof. Tânia Ricci Galati
 Pró-Reitora de Extensão


 Prof. Marcos Eduardo Capuzzo de Knupp
 Pró-Reitor de Ensino


 Prof. Rosângela de Souza Fátima
 Pró-Reitora do Núcleo Convênios e Estudantes


 Daniel de Oliveira Souza
 Coordenador do Núcleo Intermédios

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