



BRENDA LOISE MONTEIRO

**POSTNATAL OVERNUTRITION AND UNDERNUTRITION
AND IMMUNOMETABOLIC MARKERS IN MICE DURING
ADULTHOOD**

**LAVRAS – MG
2020**

BRENDA LOISE MONTEIRO

**POSTNATAL OVERNUTRITION AND UNDERNUTRITION AND
IMMUNOMETABOLIC MARKERS IN MICE DURING ADULTHOOD**

**INFLUÊNCIA DA HIPERALIMENTAÇÃO E DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR PÓS-
NATAL EM MARCADORES IMUNOMETABÓLICOS NA VIDA ADULTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde, área de concentração em Nutrição e Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

Prof.^a Dr.^a Laura Cristina Jardim Pôrto Pimenta
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Peconick
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Monteiro, Brenda Loise.

Postnatal overnutrition and undernutrition and immunometabolic markers in mice during adulthood / Brenda Loise Monteiro. - 2020.

48 p.

Orientador(a): Laura Cristina Jardim Pôrto.

Coorientador(a): Ana Paula Peconick.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2020.

Bibliografia.

1. Programação metabólica. 2. Síndrome metabólica. 3. Inflamação. I. Pôrto, Laura Cristina Jardim. II. Peconick, Ana Paula. III. Título.

BRENDA LOISE MONTEIRO

**POSTNATAL OVERNUTRITION AND UNDERNUTRITION AND
IMMUNOMETABOLIC MARKERS IN MICE DURING ADULTHOOD**

**INFLUÊNCIA DA HIPERALIMENTAÇÃO E DA RESTRIÇÃO ALIMENTAR PÓS-
NATAL EM MARCADORES IMUNOMETABÓLICOS NA VIDA ADULTA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Saúde, área de concentração em Nutrição e Saúde, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 12 de março de 2020

Prof.^a Dr.^a Laura Cristina Jardim Pôrto Pimenta UFLA

Prof.^a Dr.^a Juciane de Abreu Ribeiro Pereira UFLA

Prof. Dr. Dennys Esper Corrêa Cintra UNICAMP



Prof.^a Dr.^a Laura Cristina Jardim Pôrto Pimenta
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Ana Paula Peconick
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2020**

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço à minha família. À minha mãe Adriana e ao meu pai Beto, por todo apoio e suporte financeiro durante essa caminhada. Sem vocês não seria possível a realização deste sonho. Ao meu irmão Pedro pelo companheirismo, apoio, momentos de descontração e por sempre torcer por mim.

Ao Rafael pelo apoio desde o primeiro momento, carinho, cuidado, atenção, e por estar sempre disposto a ajudar.

À Universidade Federal de Lavras, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Nutrição e Saúde, pela oportunidade.

À minha orientadora, prof.^a Laura, por ser acolhedora e paciente, pela confiança depositada em mim, e por me encorajar sempre.

Aos professores Isabela, Lilian, Andrezza e Rodrigo, e à minha coorientadora Ana Paula, pela atenção, ajuda e colaboração com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao grupo de pesquisa Imunometabolismo (UFMG), especialmente à professora Adaliene, pela colaboração com este trabalho.

Ao Geraldo, pelo suporte técnico e amizade.

Aos alunos da graduação envolvidos na realização deste trabalho e à Isabela Perígolo, por toda a ajuda durante a execução do projeto.

A todos, meus sinceros agradecimentos e eterna gratidão!

RESUMO

Através da hipótese de programação metabólica, modificações nutricionais no período neonatal podem influenciar processos fisiológicos com repercussão na vida adulta, favorecendo ou prevenindo o desenvolvimento de alterações imunometabólicas e, conseqüentemente, a instalação de doenças crônicas. O objetivo do trabalho foi avaliar a influência da hiperalimentação e da restrição alimentar pós-natal em marcadores metabólicos e inflamatórios na vida adulta. Camundongos C57BL/6 fêmeas foram acasaladas durante um período de 10 dias. Após o nascimento dos filhotes, o tamanho das ninhadas foi remanejado para o período de lactação, obtendo os grupos experimentais: controle (C) com a ninhada padrão de 8-10 filhotes, restrição alimentar (UN) com a ninhada aumentada para 15-16 filhotes e hiperalimentação (ON) com a ninhada reduzida para 3-4 filhotes. Apenas os filhotes machos foram utilizados no estudo, sendo o processo descrito acima repetido até a obtenção do número de animais desejado para os grupos experimentais (C=8; ON=8; UN=6). Após o desmame, que ocorreu aos 21 dias de vida, os animais foram mantidos com livre acesso a água e ração comercial padrão. O peso corporal e o consumo alimentar dos animais foram aferidos semanalmente. Após a eutanásia e coleta de tecidos, que ocorreu aos 120 dias de vida, as análises bioquímicas foram realizadas através de kits comerciais. Concentrações de adipocinas séricas, bem como citocinas no tecido adiposo epididimal foram determinadas por ELISA. Lipídeos hepáticos foram extraídos pelo método de Folch e posteriormente avaliados por kits comerciais. Marcadores de estresse oxidativo (TBARS e concentração de hidroperóxidos) e enzimas antioxidantes (SOD e CAT) foram determinados por método colorimétrico. Análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism®, e a comparação entre os grupos experimentais se deu pelo teste t de student. O nível de significância adotado foi de $P < 0.05$. O grupo ON apresentou aumento do peso corporal aos 21 e 120 dias de vida, bem como aumento no peso do fígado e do tecido adiposo epididimal, enquanto o grupo UN apresentou menor peso corporal aos 21 dias de vida, e menores índice de Lee e peso do tecido adiposo epididimal. Em relação aos parâmetros bioquímicos, o grupo ON apresentou maiores concentrações séricas de glicose, colesterol total e LDL-colesterol, além de triacilglicerol hepático. O grupo UN exibiu maiores concentrações séricas de LDL-colesterol e triacilglicerol, além de menor concentração de HDL-colesterol e maior concentração hepática de triacilglicerol. Na avaliação do estresse oxidativo hepático, ambos os grupos experimentais apresentaram maiores concentrações de TBARS e hidroperóxidos, além de redução na atividade da catalase. Ambos os grupos apresentaram maior concentração de TNF- α no tecido adiposo epididimal. Em relação às adipocinas séricas, o grupo ON apresentou aumento nas concentrações de resistina e leptina, enquanto o grupo UN exibiu aumento de leptina e redução nas concentrações de resistina, quemerina e adiponectina. Dessa forma, ambos os grupos experimentais induziram alterações metabólicas e inflamatórias persistentes na vida adulta, elevando o risco de desenvolvimento de doenças metabólicas.

Palavras chave: programação metabólica; síndrome metabólica; inflamação.

ABSTRACT

According to the metabolic programming hypothesis, nutritional changes in the neonatal period may influence physiological processes with repercussions in adulthood, inducing or preventing the development of immunometabolic changes and, consequently, the genesis of chronic diseases. The aim of this study was to evaluate the influence of postnatal overnutrition and undernutrition on metabolic and inflammatory markers during adulthood. Female C57BL / 6 female mice were mated over a period of 10 days. After birth, the litters size was relocated for the lactation period, obtaining the experimental groups: control (C) with the standard litter of 8-10 pups, undernutrition (UN) with the litter increased to 15-16 pups and overnutrition (ON) with the litter reduced to 3-4 pups. Only male pups were used in the study, and the process described above was repeated until the desired number of animals was obtained for the experimental groups (C = 8; ON = 8; UN = 6). After weaning, which occurred at 21 days of age, the animals were kept with free access to water and standard chow. Body weight and food intake were measured weekly. Mice were euthanized at 120 days of age for tissue collection. Biochemical analyzes were performed using commercial kits. Concentrations of serum adipokines, as well as cytokines in the epididymal adipose tissue were determined by ELISA. Hepatic lipids were extracted by the Folch method and subsequently evaluated by commercial kits. Oxidative stress markers (TBARS and hydroperoxide concentration) and antioxidant enzymes (SOD and CAT) were determined using a colorimetric method. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism®, and the comparison between groups was done using the Student's t test. The level of significance adopted was $P < 0.05$. The ON model induced higher body weight at 21 and 120 days of life, as well as higher liver and epididymal adipose tissue weight. While the UN model presented lower body weight at 21 days, lower Lee index and epididymal adipose tissue weight at 120 days. In biochemical parameters, the ON model presented higher serum concentrations of glucose, total cholesterol and LDL-cholesterol and increased hepatic triacylglycerol. The UN model exhibited higher serum LDL-cholesterol and triacylglycerol concentrations, lower HDL-cholesterol concentration, and higher hepatic triacylglycerol concentration. In hepatic oxidative stress, both experimental groups presented higher concentrations of TBARS and hydroperoxides; also, reduction in catalase activity. Both groups presented higher concentration of TNF- α in the epididymal adipose tissue. Regarding serum adipokines, the ON group showed an increase in resistin and leptin concentrations, while the UN group showed an increase in leptin and a reduction in resistin, chemerin and adiponectin concentrations. Thus, both experimental models induced persistent metabolic and inflammatory changes in adulthood, increasing the risk of developing metabolic diseases.

Keywords: metabolic programming; metabolic syndrome; inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figure 1 – Experimental design. Control group (C), overnutrition group (ON) and undernutrition group (UN).	32
Figure 2- Serum adipokines. (A) Serum resistin (pg/mL), (B) serum leptin (pg/mL), (C) serum chemerin (pg/mL) and (D) serum adiponectin (pg/mL). Results from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups. *P<0.05 versus control.....	37
Figure 3 – Cytokines in adipose tissue. (A) TNF- α in epididymal adipose tissue (pg/mL), (B) IL-10 in epididymal adipose tissue (pg/mL). Results from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups. *P<0.05 vs control.....	38
Figure 4- Hepatic oxidative stress. (A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (nmolMDA/mg of protein), (B) hydroperoxides (μ mol/mg of protein), (C) catalase activity (Δ E/min/mg of protein) and (D) superoxide dismutase (U/mg of protein). Results from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups. *P<0.05 versus control.	39

LISTA DE TABELAS

Table 1. Body weight (BW) at 21 and 120 days, Lee index, epididymal adipose tissue (EAT) weight, liver weight and food intake at 1-3, 4-6, 7-9 and 10-13 weeks from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups.....	35
Table 2. Fasting glucose and lipidic profile from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

AGL	Ácido graxo livre
BMI	Índice de massa corporal
BW	Peso corporal
C	Controle
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética em experimentação animal
cm	Centímetros
DCNTs	Doenças crônicas não transmissíveis
DHGNA	Doença hepática gordurosa não alcoólica
DM	Diabetes mellitus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GLUT-4	Transportador de glicose 4
HDL	Lipoproteína de alta densidade
I-DBSM	Primeira diretriz brasileira de síndrome metabólica
IL-10	Interleucina-10
IRS-1	Substrato do receptor de insulina-1
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
mg/dL	Miligramas por decilitro
Mg/Kg	Miligramas por quilo
ml	Mililitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NCEP-ATP III	National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III
NF-KB	Fator nuclear- kappa B
OMS	Organização mundial da saúde
ON	Overnutrition
PNS	Pesquisa nacional de saúde
rpm	Rotações por minuto

LISTA DE ABREVIATURAS (continuação)

SEM	Erro padrão da média
SOD	Superóxido dismutase
SOD	Superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TLR-4	Receptor tipo toll-4
TNF- α	Fator de necrose tumoral- alpha
UFLA	Universidade Federal de Lavras
UN	Undernutrition
VLDL	Lipoproteína de muito baixa densidade

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
Δ	Delta
\mathbf{K}	Kappa
$>$	Maior
\geq	Maior ou igual
\pm	Mais ou menos
$<$	Menor
μ	Micro
\textcircled{R}	Registrado

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	13
1. INTRODUÇÃO	13
2. REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1. Programação Metabólica	14
2.2. Alterações Metabólicas e Inflamatórias: tecido adiposo, inflamação e o papel das adipocinas	16
2.3. Alterações Metabólicas e Inflamatórias: o papel do fígado e o estresse oxidativo	19
2.4. Modelos experimentais	20
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
4. REFERÊNCIAS	22
SEGUNDA PARTE	26
Postnatal overnutrition and undernutrition induce persistent metabolic and inflammatory disorders during adulthood	27
ANEXO I	48

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A programação metabólica se refere a eventos experienciados no início da vida, como nas fases intrauterina e de lactação, que são capazes de influenciar processos fisiológicos posteriormente, potencialmente predispondo ou prevenindo o indivíduo ao desenvolvimento de disfunções imunometabólicas na vida adulta e, conseqüentemente, a instalação de doenças crônicas. Esse processo é possível, uma vez que a plasticidade neurológica e imunológica nesses períodos críticos do desenvolvimento permite que, através de mecanismos epigenéticos, fatores ambientais como o estilo de vida materno e a ingestão alimentar neonatal alterem a expressão gênica, modificando parâmetros envolvidos no controle da fome e da saciedade, no metabolismo e na regulação do gasto energético.

Nesse sentido, programação metabólica e fatores ambientais – hábitos alimentares, grau de atividade física, estresse e exposição à xenobióticos – configuram uma complexa rede de interação que pode culminar no desenvolvimento de Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNTs), uma vez que o estilo de vida pode influenciar a programação metabólica, bem como acelerar a instalação dessas desordens em indivíduos predispostos.

Atualmente, as DCNTs representam a principal causa de mortalidade no mundo, segundo dados divulgados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2018. No Brasil, o aumento na prevalência de DCNTs a partir das últimas décadas do século XX se relaciona com mudanças sociais provocadas pelo fenômeno do êxodo rural. Nesse contexto, a população brasileira iniciou os processos de transição demográfica, com o aumento na expectativa de vida, e nutricional – aumento no consumo de alimentos ultraprocessados em detrimento dos *in natura*.

Modelos experimentais de programação metabólica, apesar de não reproduzirem perfeitamente toda a complexidade do organismo humano, são fundamentais para a elaboração de estratégias de prevenção precoce em saúde em diferentes situações sociais. Investigar o aumento do consumo energético materno durante o período gestacional ou da prole durante o período de lactação, pode oferecer elucidacões acerca do impacto dos padrões alimentares referidos como ocidentais – alto consumo energético e/ou baixa qualidade nutricional. Ao mesmo tempo, estudar modelos de restrição alimentar nos estágios iniciais da vida podem

subsidiar ações preventivas voltadas para populações em situação de pobreza e escassez de alimentos.

Os modelos de hiperalimentação e restrição alimentar através do remanejamento de ninhadas apresentam diferentes cenários para o desenvolvimento de disfunções metabólicas e inflamatórias. Estudos prévios demonstram que a hiperalimentação pós-natal resulta em aumento do peso corporal, alteração nas secreções de insulina e leptina, além de mudanças na composição lipídica de membranas celulares (GUILLOTEAU et al, 2009; HABBOUT et al, 2013; PLAGEMANN et al, 2008). Em relação ao modelo de restrição alimentar, estudos sugerem o aumento do estado inflamatório e do risco cardiovascular, além de alteração na secreção de leptina e menor desempenho reprodutivo na vida adulta (MORAIS et al, 2019; VISKER & FERGUSON, 2018; CARON et al, 2012; REMMERS et al, 2008). Apesar dessas evidências, os modelos experimentais supracitados necessitam ser mais bem explorados, a fim de ampliar a discussão no campo da programação metabólica e bem como sua relação com as DCNTs.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da hiperalimentação e da restrição alimentar no período pós-natal em marcadores metabólicos e inflamatórios durante a vida adulta.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Programação Metabólica

A programação metabólica se refere a eventos ocorridos nos períodos iniciais da vida que apresentam capacidade de influenciar processos fisiológicos durante a vida adulta (HANLEY et al, 2010). Nesse contexto, mecanismos epigenéticos podem alterar a expressão gênica durante esses períodos críticos do desenvolvimento (fase intrauterina e pós-natal precoce), potencialmente prevenindo ou predispondo os indivíduos a um fenótipo obesogênico, além de disfunções metabólicas persistentes na vida adulta (BLOCK & EL-OSTA, 2017).

Essas modificações epigenéticas podem ser fomentadas por uma série de condições ambientais, incluindo o padrão alimentar e o grau de atividade física materna, bem como a ingestão alimentar neonatal. (BLOCK & EL-OSTA, 2017; HANLEY et al, 2010). A ocorrência da programação metabólica é possível, pois a plasticidade do desenvolvimento nos estágios iniciais da vida permite que fatores ambientais influenciem o desdobramento neurológico e imunológico, bem como o controle da fome e da saciedade e a regulação do gasto energético

(HANLEY et al, 2010; LEVIN, 2000). Nesse sentido, modulações nutricionais durante os períodos de gestação e lactação podem prevenir ou favorecer a instalação de disfunções metabólicas e inflamatórias durante a vida adulta, e conseqüentemente, o desenvolvimento de doenças crônicas.

A hipótese de “origem fetal das doenças”, também referida como hipótese de Barker, propõe que o grau de nutrição e o status hormonal intrauterino pode resultar em adaptações que alteram processos fisiológicos permanentemente, predispondo o indivíduo à ocorrência de doenças metabólicas na vida adulta (BLOCK & EL-OSTA, 2017; GUILLOTEAU et al, 2009). Dessa forma, os efeitos deletérios da obesidade e desnutrição ocorrem durante períodos específicos de desenvolvimento fetal e pós-natal, onde as memórias epigenéticas podem ser moduladas (BLOCK & EL-OSTA, 2017). Em relação à programação do tecido adiposo, esse período crítico de desenvolvimento coincide com o da adipogênese sendo que, em roedores, a adipogênese é iniciada durante o período perinatal e acelerada durante o início da vida pós-natal. Como resultado, as células-tronco dos adipócitos são particularmente sensíveis aos fatores maternos durante a lactação (LECOUTRE et al, 2018).

O estilo de vida, caracterizado pelos hábitos alimentares, grau de atividade física e exposição ambiental, se apresenta como um elo de associação entre a programação metabólica e o desenvolvimento de DCNTs, uma vez que o mesmo pode influenciar alterações na expressão gênica durante as fases iniciais da vida, bem como pode acelerar ou retardar a instalação dessas doenças nos indivíduos predispostos (BLOCK & EL-OSTA, 2017; HANLEY et al, 2010; I-DBSM, 2005). Atualmente, as DCNTs representam a principal causa de mortalidade e incapacidade prematura em todo o mundo (OPAS, 2018), sendo responsáveis por 51,6% do total de óbitos na população brasileira entre 30 a 69 anos, no ano de 2015 (BRASIL, 2018).

No Brasil, durante as últimas décadas, houve um grande aumento no número de pessoas com excesso de peso e comorbidades associadas nos países desenvolvidos e em desenvolvimento, fato associado às alterações no estilo de vida da população a partir do crescimento econômico das cidades e do êxodo rural (TASSITANO et al, 2009). A implantação do estilo de vida urbano cursa com uma grande transição nutricional, onde hábitos alimentares saudáveis, como o consumo de alimentos *in natura*, deram lugar ao consumo de alimentos ultraprocessados de grande densidade calórica e baixa qualidade nutricional (SOUZA, 2010). Concomitantemente, a população brasileira vive uma situação de transição demográfica, com significativa redução nas taxas de fecundidade e natalidade, e aumento progressivo na expectativa de vida, resultando no aumento da proporção de idosos em relação às demais faixas

etárias (BRASIL, 2005). Esses processos de transição contribuem para uma grande mudança no cenário epidemiológico brasileiro iniciado a partir das duas últimas décadas do século XX, onde apesar de algumas regiões do país ainda apresentarem elevadas taxas de mortalidade por doenças infecciosas, como a malária e a doença de Chagas, as DCNTs emergem como grandes responsáveis pela morbimortalidade no país (ARAUJO, 2012).

Visto a complexidade que envolve a gênese das DCNTs, a prevenção primária é um desafio mundial com grande repercussão nos sistemas de saúde. A adoção precoce de um estilo de vida saudável por parte da população é componente básico da prevenção e deve ser iniciado ainda na infância (I-DBSM, 2005). Dessa forma, o estudo da programação metabólica se faz necessário para a elaboração de estratégias de prevenção precoce contra as DCNTs.

2.2 Alterações Metabólicas e Inflamatórias: tecido adiposo, inflamação e o papel das adipocinas

Citocinas e adipocinas secretadas pelo tecido adiposo apresentam uma importante atividade na regulação da homeostase energética, bem como contribuem para a manutenção da inflamação crônica de baixo grau associada ao excesso de adiposidade (ATAWIA et al, 2019). Na expansão do tecido adiposo ocorre redução da angiogênese e aumento da hipóxia no tecido, criando um ambiente celular estressor que eleva a secreção de citocinas pró-inflamatórias, e essas fazem o recrutamento de células imunológicas, perpetuando o ciclo de estresse celular e a inflamação, que contribui com o desenvolvimento de disfunções metabólicas em órgãos como fígado e músculos (MARTINS et al, 2017; ATAWIA et al, 2019). O aumento do tecido adiposo é acompanhado por mudanças no perfil de células da imunidade inata. Mais de 90% dos macrófagos presentes no tecido adiposo branco estão localizados em torno de adipócitos necróticos, formando uma estrutura denominada *crown-like structures*, cuja densidade é associada a resistência à insulina e à inflamação no tecido adiposo (CINTI et al, 2005). Essa disfunção altera o fenótipo dos macrófagos do tecido adiposo de um estado anti-inflamatório (M2) para pró-inflamatório (M1), onde macrófagos M1 operam secretando maiores concentrações de citocinas inflamatórias, especialmente o fator de necrose tumoral α (TNF α) (LUMENG et al, 2007; REILLY & SALTIEL, 2017).

Apesar de ser comumente relacionada com a obesidade, a presença de citocinas ligadas à resposta inflamatória também é importante na regulação da expansão e no remodelamento do tecido adiposo (MARTINS et al, 2017). Avaliando camundongos magros submetidos a um período de privação alimentar, Lacerda et al (2019) demonstraram que a resposta inflamatória

no tecido adiposo destes animais estava aumentada, fato que contribuiu para a redução da massa adiposa.

O tecido adiposo visceral é descrito como principal promotor de citocinas pró-inflamatórias devido ao acúmulo de macrófagos com fenótipo M1. Esse processo gera repercussões metabólicas como a resistência à insulina e o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (MARTINS et al, 2017; MAGRONE & JIRILLO, 2015). A partir da liberação de citocinas e adipocinas inflamatórias pelo tecido adiposo, o estado de cronicidade da inflamação de baixo grau, influenciado pelo estresse oxidativo, ativa a resposta imune inata exacerbando o processo inflamatório já previamente iniciado (MARSEGLIA et al, 2015).

Diversas adipocinas são associadas ao desenvolvimento e manutenção de desordens metabólicas, dentre elas a resistina, que é uma adipocina pró inflamatória, cuja nomenclatura é associada à sua atuação no processo de resistência à insulina, devido a inibição da via de sinalização da insulina (ATAWIA et al, 2019; ESTIENNE et al, 2019). Em roedores, a resistina é encontrada principalmente no tecido adiposo branco, enquanto em humanos é predominantemente expressa por macrófagos. Questões relativas ao receptor de resistina ainda não são completamente elucidadas, mas sugere-se que os receptores tipo toll 4 (TLR4) sejam capazes de mediar a resposta inflamatória dessa adipocina em células humanas. Na síndrome metabólica, a resistina pode estar associada a marcadores inflamatórios que se manifestam em diferentes estágios do desenvolvimento, correlacionando-se com parâmetros metabólicos, como as concentrações séricas de glicose e de lipídeos (ABELLA et al, 2014).

Outra adipocina associada a disfunções metabólicas é a leptina, secretada principalmente por adipócitos maduros, e suas concentrações são diretamente relacionadas com o volume de tecido adiposo. Possui ação no núcleo hipotalâmico, induzindo fatores anorexígenos e suprimindo neuropeptídeos orexígenos; entretanto, sua síntese é regulada por mediadores inflamatórios, podendo ser correlacionada com alterações na glicemia e resistência à insulina, uma vez que induz a produção de TNF α , IL-6 e espécies reativas de oxigênio (KUMARI et al, 2019; ABELLA et al, 2014; ATAWIA et al, 2019). O aumento das concentrações de leptina pode prever o desenvolvimento da síndrome metabólica independente da obesidade, fato atribuído à sua correlação positiva com alterações do metabolismo da glicose e concentrações plasmáticas de triacilglicerol (ABELLA et al, 2014).

A quemerina também possui relação com esse processo de disfunção metabólica. Seus receptores estão presentes em diversas partes do corpo humano, desempenhando papel multifuncional na regulação de funções quimiotáticas, adipogênicas, angiogênicas e reprodutivas (SINGH et al, 2018). Essa adipocina pode ser considerada um marcador precoce

da gênese da síndrome metabólica, pois altas concentrações plasmáticas de quemerina são associadas com o aumento da adiposidade, do triacilglicerol sérico e da pressão arterial, bem como o desenvolvimento de resistência à insulina (SINGH et al, 2018; ABELLA et al, 2014).

A adiponectina é uma adipocina com característica anti-inflamatória, capaz de alterar a sinalização do fator nuclear- κ B (NF- κ B) e melhorar a ação da insulina em tecidos periféricos (KUMARI et al, 2019). Dentre as ações da adiponectina, destacam-se o aumento da oxidação de gorduras e da captação de glicose pelos músculos, e a redução do processo de gliconeogênese. Ainda, essa adipocina atua na supressão da produção de TNF α e aumenta o número de macrófagos M2 no tecido (ATAWIA et al, 2019), podendo ser considerada um biomarcador de correlação negativa com o desenvolvimento da síndrome metabólica, uma vez que a hipoadiponectinemia é fortemente relacionada com a inflamação e as disfunções metabólicas características dessa comorbidade (ABELLA et al, 2014).

O TNF α é uma citocina pró inflamatória expressa em maior quantidade no tecido adiposo visceral que no subcutâneo, e mais abundantemente secretada pelos macrófagos do que pelos adipócitos. O grau de expressão dessa citocina no tecido adiposo é positivamente correlacionado com o aumento da gordura corporal e com a hiperinsulinemia (KUMARI et al, 2019). O TNF α gera prejuízos na cascata de fosforilação da insulina, por induzir a fosforilação de serina ou treonina no substrato do receptor de insulina 1 (IRS-1), culminando na inadequada sinalização em cascata dessa via, redução da translocação do transportador de glicose 4 (GLUT-4) para a membrana celular, e menor captação de glicose pelas células (YARIBEYGI et al, 2018). Além disso, o TNF α também está associado com o aumento da lipólise no tecido adiposo, aumentando a concentração de Ácidos Graxos Livres (AGL) e colesterol na circulação, e conseqüentemente, o acúmulo ectópico de gordura no músculo esquelético e fígado (ATAWIA et al, 2019).

A Interleucina-10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória, secretada por macrófagos M2, e associada ao perfil regulatório da resposta imune (RUIZ-CANELA et al, 2016; SRIKANTHAN et al, 2016). A IL-10 pode atuar suprimindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α e IL-1 β , além de inibir a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, reduzindo o estresse oxidativo resultante dessa enzima, e melhorando a resposta de sinalização da insulina (SRIKANTHAN et al, 2016).

Apesar da forte relação entre citocinas e adipocinas com a inflamação crônica de baixo grau e o desenvolvimento de disfunções metabólicas, a influência da programação metabólica na secreção desses sinalizadores celulares precisa ser mais bem compreendida.

2.3 Alterações Metabólicas e Inflamatórias: o papel do fígado e o estresse oxidativo

O fígado é o principal órgão regulador da homeostase metabólica, mediando a interação entre o ambiente externo, como a ingestão alimentar, e o meio interno. Sendo assim, o acúmulo excessivo de gordura nos hepatócitos se relaciona com o desenvolvimento de inúmeras complicações metabólicas, como o diabetes mellitus e as doenças cardiovasculares (ESLAM et al, 2019). O aumento da prevalência de doença hepática gordurosa não alcoólica (DHGNA) está associado com a ocorrência da obesidade e da síndrome metabólica. A DHGNA está associada com a redução da sensibilidade à insulina, uma vez que ocorre o aumento da liberação de AGL e colesterol na circulação, favorecendo a deposição ectópica desses lipídeos e, conseqüentemente, a esteatose hepática (ATAWIA et al, 2019). Além disso, concentrações elevadas de AGL afetam a produção de óxido nítrico e prejudicam o processo de vasodilatação, podendo acarretar disfunções cardiovasculares (DINANI et al, 2017).

O aumento da secreção de citocinas pró inflamatórias pelo tecido adiposo favorece a elevação da taxa de lipólise nesse tecido, e conseqüentemente, resulta em hiperlipidemia e deposição ectópica de gordura, principalmente no fígado e no músculo esquelético (ATAWIA, et al, 2019). O acúmulo excessivo de lipídeos no fígado consiste em um estado pró inflamatório, e contribuiu para a manutenção da resistência à insulina e desenvolvimento da disfunção endotelial (DINANI, et al, 2017). Esse fato é atribuído ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam à peroxidação lipídica, resultando em inflamação e fibrogênese por meio da ativação de células estreladas (DINANI et al, 2017). Ainda, a presença de EROs pode aumentar a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), promovendo a transformação de macrófagos em células espumosas, que é o primeiro passo na formação de uma lesão aterosclerótica (DINANI et al, 2017).

O estado de estresse oxidativo é resultado do desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favorecimento da produção excessiva de EROs e/ou do retardo na eliminação desses compostos pelo sistema de defesa antioxidante (RUPÉREZ et al, 2014). EROs são produtos instáveis, decorrentes da redução tetravalente sofrida pela molécula de oxigênio, aceitadora final de elétrons, durante a produção de energia na etapa de fosforilação oxidativa (FRANÇA et al, 2013). A produção exacerbada de EROs é relacionada com a perda de função e morte celular, com disfunções lipídicas e danos no DNA, contribuindo para o desenvolvimento e progressão das DCNTs (DÍAZ-CASADO et al, 2019).

O sistema de defesa antioxidante contempla componentes enzimáticos e não enzimáticos, que atuam de maneira coordenada para resistir aos distúrbios redox nas células e proteger o organismo dos danos provocados pelo estresse oxidativo. O sistema enzimático conta com enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que compreende a primeira linha de defesa contra os radicais superóxidos, transformando esses em peróxido de hidrogênio, e a catalase, que atua na reação de transformação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (POWERS & JACKSON, 2008). O sistema de defesa não enzimático conta com vitaminas de características antioxidantes (vitaminas C e E), compostos bioativos presentes em alimentos vegetais, como o resveratrol e o licopeno, além de ácido úrico e bilirrubina (POWERS & JACKSON, 2008; MARINELI et al, 2015).

2.4 Modelos experimentais

A prevalência de DCNTs cresce em escala mundial, fazendo-se necessário o desenvolvimento de investigações científicas que visem elucidar mecanismos fisiopatológicos, bem como subsidiar a proposição de novas intervenções para a prevenção e o tratamento desses distúrbios. Dessa forma, pesquisadores utilizam de modelos experimentais a fim de contribuir com os avanços científicos (FUCHS et al, 2018; CESARETTI & JUNIOR, 2006).

O uso de animais como modelo de experimentação científica é de grande importância para pesquisas na área da saúde; entretanto, os resultados obtidos não são, necessariamente, análogos aos encontrados em seres humanos, fato que torna-se um desafio no momento de traduzir esses achados para a prática clínica (FUCHS et al, 2018). Sabe-se que não existe um modelo experimental capaz de reproduzir perfeitamente todos os aspectos das disfunções metabólicas humanas, sendo fundamental conhecer as limitações do modelo utilizado para a correta interpretação de dados. Nesse contexto, a escolha por roedores é interessante, pois esses animais permitem uma ampla visão acerca dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas DCNTs, devido à similaridade imunológica e metabólica com o organismo humano, além do pequeno porte e fácil manejo (LUTZ, 2018).

Modelos experimentais de programação metabólica são importantes para promover ações preventivas em saúde. Investigar a hiperalimentação materna ou da prole durante o período pós-natal pode fornecer maiores esclarecimentos acerca da influência dos hábitos alimentares do mundo ocidental – auto consumo energético e/ou baixa qualidade nutricional. Por outro lado, modelos de restrição alimentar nos estágios iniciais da vida podem subsidiar estratégias preventivas voltadas para populações em situação de pobreza, bem como

compreender as consequências da restrição do crescimento intrauterino devido a alterações placentárias (GUILLOTEAU et al, 2009).

Em roedores, a hiperalimentação e a restrição alimentar durante o período de lactação resulta em modificações do crescimento ao longo da vida. A hiperalimentação pós-natal resulta no rápido ganho de peso do filhote, sendo que o excesso de peso e alterações na composição lipídica de membranas celulares são observadas durante a vida adulta (GUILLOTEAU et al, 2009). Em contrapartida, os animais submetidos ao modelo de restrição alimentar pós-natal, apresentam alterações imunológicas importantes, como a redução da capacidade de resposta contra patógenos e o aumento da expressão de NF- κ B, bem como alterações do sistema cardiovascular (MORAES et al, 2019; VISKER & FERGUSON, 2018).

O modelo de hiperalimentação pós-natal por meio da redução do tamanho das ninhadas promove uma diminuição na competição alimentar durante o período de amamentação, resultando na maior disponibilidade de leite e no aumento da ingestão alimentar (XIAO et al, 2007; HABBOUT et al, 2013). Logo após o nascimento, as ninhadas originais são reduzidas para 3-4 filhotes, e como consequência há um aumento no peso corporal, persistente em menor grau na vida adulta, além de alterações na regulação hormonal-metabólica, que inclui o aumento na secreção de insulina e leptina, que pode desequilibrar o consumo alimentar e o gasto energético (PLAGEMANN et al, 2008; HABBOUT et al, 2013).

O modelo experimental de restrição alimentar pós-natal apresenta o princípio reverso do modelo de hiperalimentação. Neste caso, ocorre um aumento na competição alimentar durante o período de lactação que culmina na menor disponibilidade de leite para a prole. Após o nascimento, as ninhadas originais são aumentadas para 15-16 filhotes, promovendo uma adaptação para a sobrevivência dos animais que exibem menor peso e comprimento corporal no momento do desmame, além de alterações na secreção de leptina, e prejuízos no crescimento e no desempenho reprodutivo durante a vida adulta (CARON et al, 2012; REMMERS et al, 2008).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A manutenção do estado nutricional adequado em momentos iniciais da vida, como as fases intrauterina e a lactação, é de suma importância visto que alterações alimentares, como a hiperalimentação e a restrição alimentar, nesses períodos críticos podem predispor o indivíduo

ao desenvolvimento de alterações metabólicas e inflamatórias persistentes, elevando o risco de desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta.

O estudo da programação metabólica é fundamental para a elaboração de políticas preventivas em saúde; no entanto, é um campo do conhecimento que ainda possui muito a ser elucidado, fato que reforça a importância do desenvolvimento deste trabalho.

4 REFERÊNCIAS

ABELLA, Vanessa et al. **Adipokines, Metabolic Syndrome and Rheumatic Diseases**. Journal Of Immunology Research, [s.l.], v. 2014, p.1-14, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/343746>.

ARAUJO, José D. de. **Polarização epidemiológica no Brasil**. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 4, n. 21, p.533-538, out. 2012.

ATAWIA, Reem T. et al. **Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions**. Frontiers In Bioscience, [n.], v. 24, p.890-934, 10 ago. 2019.

AUGUST, Pauline M. et al. **Effect of maternal antioxidant supplementation and/or exercise practice during pregnancy on postnatal overnutrition induced by litter size reduction: Brain redox homeostasis at weaning**. International Journal Of Developmental Neuroscience, [s.l.], v. 71, p.146-155, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2018.09.003>.

BLOCK, Tomasz; EL-OSTA, Assam. **Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease**. Atherosclerosis, [s.l.], v. 266, p.31-40, nov. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.003>.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Sobre a Vigilância de DCNT**. 2018. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/noticias/43036-sobre-a-vigilancia-de-dcnt>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. **A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis: DCNT do contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro**. 2005. Disponível em: <<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/DCNT.pdf>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

CARON, Emilie et al. **Alteration in Neonatal Nutrition Causes Perturbations in Hypothalamic Neural Circuits Controlling Reproductive Function**. Journal Of Neuroscience, [s.l.], v. 32, n. 33, p.11486-11494, 15 ago. 2012. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.6074-11.2012>.

CINTI, Saverio et al. **Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans**. Journal Of Lipid Research, [s.l.], v. 46, n. 11, p.2347-2355, 8 set. 2005. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m500294-jlr200>.

DÍAZ-CASADO, Helena M. et al. **The Paradox of Coenzyme Q10 in Aging**. *Nutrients*, [s.l.], v. 11, n. 9, p.2221-2244, 14 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11092221>.

DINANI, Amreen; SANYAL, Arun. **Nonalcoholic fatty liver disease**. *Cardiovascular Endocrinology*, [s.l.], v. 6, n. 2, p.62-72, jun. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/xce.0000000000000126>.

ESLAM, Mohammed; GEORGE, Jacob. **Genetic contributions to NAFLD: leveraging shared genetics to uncover systems biology**. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, [s.l.], p.01-13, 22 out. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0212-0>.

ESTIENNE, Anthony et al. **Involvement of Novel Adipokines, Chemerin, Visfatin, Resistin and Apelin in Reproductive Functions in Normal and Pathological Conditions in Humans and Animal Models**. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 20, n. 18, p.4431-4443, 9 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20184431>.

FRANÇA, Bruna K. et al. **Peroxidação lipídica e obesidade: Métodos para aferição do estresse oxidativo em obesos**. *Jornal Português de Gastreenterologia*, [s.l.], v. 20, n. 5, p.199-206, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpg.2013.04.002>.

GRUNDY, Scott M. et al. **Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement**. *Circulation*, [s.i.], v. 4, n. 112, p.2735-2752, out. 2005.

GUILLOTEAU, P. et al. **Adverse Effects Of Nutritional Programming During Prenatal And Early Postnatal Life, Some Aspects Of Regulation And Potential Prevention And Treatments**. *Journal Of Physiology And Pharmacology*, [s.i.], v. 3, n. 60, p.17-35, mar. 2009.

HABBOU, Ahmed et al. **Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences**. *The Journal Of Nutrition*, [s.l.], v. 143, n. 5, p.553-562, 27 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/jn.112.172825>.

HANLEY, Bryan et al. **Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities**. *British Journal Of Nutrition*, [s.l.], v. 104, n. 1, p.1-25, jul. 2010. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s0007114510003338>.

INTERNACIONAL DIABETES FEDERATION (Bélgica). **The IDF consensus worldwide definition of the metabolic syndrome**. 2006. Disponível em: <<https://www.idf.org/e-library/consensus-statements/60-idfconsensus-worldwide-definitionof-the-metabolic-syndrome.html>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

KUMARI, Reena et al. **An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome**. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, [s.l.], v. 13, n. 4, p.2409-2417, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2019.06.005>.

LACERDA, Débora R. et al. **Role of adipose tissue inflammation in fat pad loss induced by fasting in lean and mildly obese mice.** The Journal Of Nutritional Biochemistry, [s.l.], v. 72, p.108208-108216, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.06.006>.

LEVIN, Barry et al. **Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis.** Philosophical Transactions Of The Royal Society: Biological Sciences, [s.l.], v. 361, n. 1471, p.1107-1121, 29 jul. 2006. The Royal Society. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2006.1851>.

LUMENG, Carey M. et al. **Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization.** The Journal Of Clinical Investigation , [s.i], v. 117, n. 1, p.175-184, jan. 2007.

LUTZ, Thomas A. **Considering our methods: Methodological issues with rodent models of appetite and obesity research.** Physiology & Behavior, [s.l.], p.1-16, fev. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2018.02.026>.

MAGRONE, Thea; JIRILLO, Emilio. **Childhood obesity: immune response and nutritional approaches.** Frontiers in Immunology, v. 6, p. 1 – 13, 2015.

MARINELI, Rafaela da S. et al. **Antioxidant potential of dietary chia seed and oil (Salvia hispanica L.) in diet-induced obese rats.** Food Research International, [s.l.], v. 76, p.666-674, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.07.039>.

MARSEGLIA, Lucia. et al. **Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases.** International Journal of Molecular Sciences, v. 16, p. 378 – 400, 2015.

MARTINS, Laís B. et al. **Paradoxical role of tumor necrosis factor on metabolic dysfunction and adipose tissue expansion in mice.** Nutrition, v. 50, p.1-7, jun. 2017.

MORAIS, Natália G. de et al. **Impact of neonatal malnutrition on expression TLR-9, NF- κ B and cytokines of macrophages infected in vitro with methicillin resistant Staphylococcus aureus.** Microbial Pathogenesis, [s.l.], v. 132, p.254-260, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.009>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **The top 10 causes of death.** 2018. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 01 nov. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **10 principais causas de morte no mundo.** 2018. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5638:10-principais-causas-de-morte-no-mundo&Itemid=0. Acesso em: 01 nov. 2019.

PLAGEMANN, A. et al. **A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation.** Journal of Maternal Fetal and Neonatal Medicine, v. 21, n. 3, p. 143-8, 2008.

POWERS, Scott K.; JACKSON, Malcolm J. **Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production.** Physiological Reviews, [s.l.], v. 88,

n. 4, p.1243-1276, out. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>.

RAMIRES, Elyssia K. N. M. et al. **Prevalence and Factors Associated with Metabolic Syndrome among Brazilian Adult Population: National Health Survey - 2013**. Arquivos Brasileiros de Cardiologia, [s.l.], p.455-466, 2018. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.5935/abc.20180072>.

REILLY, Shannon M.; SALTIEL, Alan R. **Adapting to obesity with adipose tissue inflammation**. Nature Reviews Endocrinology, [s.l.], v. 13, n. 11, p.633-643, 11 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>.

REMMERS, Floor et al. **Delemarre-van de. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake**. Physiology & Behavior, [s.l.], v. 95, n. 1-2, p.208-215, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.05.021>.

RUIZ-CANELA, Miguel et al. **The Role of Dietary Inflammatory Index in Cardiovascular Disease, Metabolic Syndrome and Mortality**. International Journal Of Molecular Sciences, [s.l.], v. 17, n. 8, p.1265-1281, 3 ago. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17081265>.

RUPÉREZ, Azahara et al. **Genetics of Oxidative Stress in Obesity**. International Journal Of Molecular Sciences, [s.l.], v. 15, n. 2, p.3118-3144, 20 fev. 2014. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15023118>.

SINGH, Anusha et al. **Adiponectin and Chemerin: Contrary Adipokines in Regulating Reproduction and Metabolic Disorders**. Reproductive Sciences, [s.l.], v. 25, n. 10, p.1462-1473, 18 abr. 2018. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1933719118770547>.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA (Brasil). **I diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica**. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2005000700001>. Acesso em: 01 nov. 2019.

SOUZA, Elton B. de. **Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores**. Cadernos Unifoa, Volta Redonda, v. 13, p.49-53, ago. 2010.

SRIKANTHAN, Krithika et al. **Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population**. International Journal Of Medical Sciences: International Journal of Medical Sciences, [s.i.], v. 1, n. 13, p.25-38, jan. 2016.

TASSITANO, Rafael M. et al. **Prevalência e fatores associados ao sobrepeso e à obesidade em adolescentes, estudantes de escolas de Ensino Médio de Pernambuco, Brasil**. Caderno de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 12, n. 25, p.2639-2652, dez. 2009.

VISKER, J. R.; FERGUSON, D. P. **Postnatal undernutrition in mice causes cardiac arrhythmogenesis which is exacerbated when pharmacologically stressed**. Journal Of Developmental Origins Of Health And Disease, [s.l.], v. 9, n. 4, p.417-424, 12 abr. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s2040174418000156>.

XIAO, Qiu et al. **Excess Weight Gain during the Early Postnatal Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive Thermogenesis.** *Endocrinology*, [s.l.], v. 148, n. 9, p.4150-4159, set. 2007. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0373>.

YARIBEYGI, Habib et al. **Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms.** *Journal Of Cellular Physiology*, [s.i], v. [], n. [], p.1-10, set. 2018.

SEGUNDA PARTE

**ARTIGO – POSTNATAL OVERNUTRITION AND UNDERNUTRITION INDUCE
PERSISTENT METABOLIC AND INFLAMMATORY DISORDERS DURING
ADULTHOOD**

Este trabalho será submetido ao periódico Nutrition ISSN: 0899-9007, sendo apresentado de modo preliminar em acordo com as normas de publicação do periódico.

Postnatal overnutrition and undernutrition induce persistent metabolic and inflammatory disorders during adulthood

RUNNING HEAD: Metabolic programming and persistent metabolic disorders

Brenda Loise Monteiro¹, Isabela Queiroz Perígolo Lopes¹, Lilian Gonçalves Teixeira¹, Adaliene Versiani Matos Ferreira², Andrezza Fernanda Santiago¹, Ana Paula Peconick³, Isabela Coelho de Castro¹, Laura Cristina Jardim Pôrto¹, *

1. Department of Nutrition, University Federal of Lavras, Lavras, Brazil.
2. Department of Nutrition, Nursing School, University Federal of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
3. Department of Veterinary Medicine, University Federal of Lavras, Lavras, Brazil.

*Corresponding author: Laura C. J. Pôrto, University Campus, 37200-000, Department of Nutrition, University Federal of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil. Telephone number: +55(35)38291409. E-mail: laurap@ufla.br

WORD COUNTY: 4422

NUMBER OF FIGURES: 4

NUMBER OF TABLES: 2

Abstract

In metabolic programming nutritional changes in the neonatal period may impact physiological processes during adulthood, potentially inducing or preventing the development of metabolic and inflammatory disorders, and consequentially chronic diseases. The aim of this study was to evaluate the influence of postnatal overnutrition and undernutrition on metabolic and inflammatory markers during adulthood. Female C57BL/6 mice were mated over a period of 10 days. After the birth, the litters size was relocated to the lactation period, obtaining the experimental groups: control (C) with 8-10 pups, undernutrition (UN) with 15-16 pups, and overnutrition (ON) with 3-4 pups. Only male were used in the study, and the procedure described was repeated until the desired number of mice was obtained for the experimental

groups (C=8; ON=8; UN=6). Throughout the experimental period (120 days), the animals received water and standard chow *ad libitum*. Statistical analyzes were performed using the GraphPad Prism software, and the comparison between groups was performed using the Student's t test. The level of significance adopted was $p < 0.05$. The ON model induced higher body weight as well as higher liver and epididymal adipose tissue weight, while the UN model presented lower body weight at 21 days and lowers Lee index and epididymal adipose tissue weight at 120 days. In biochemical parameters, the ON model presented higher serum concentrations of glucose, total cholesterol and LDL-cholesterol and increased hepatic triacylglycerol. The UN model exhibited higher serum LDL-cholesterol and triacylglycerol concentrations, lower HDL-cholesterol concentration, and higher hepatic triacylglycerol concentration. In hepatic oxidative stress analyzes, both experimental groups presented higher concentrations of TBARS and hydroperoxides; also, reduction in catalase activity. Both groups had a higher level of TNF- α in the epididymal adipose tissue. In serum adipokines, the ON group showed an increase in resistin and leptin concentrations, while the UN group showed an increase in leptin and a reduction in resistin, chemerin and adiponectin levels. Thus, ON and UN models caused metabolic and inflammatory disorders that were persistent during adulthood.

Keywords: metabolic programming; metabolic syndrome; inflammation.

INTRODUCTION

Metabolic programming corresponds to events that occur in early life and have ability to impact physiological outcomes in adult life [1]. In this process, epigenetic mechanisms can influence gene expression during early life (intrauterine and postnatal), a time when developmental plasticity can be impacted by external factors, such as postnatal nutritional state, that influence neurological and immunological development, as well as the control of hunger and satiety, and the regulation of energy expenditure [1,2,3]. In this context, nutritional status in early life may promote physiological adaptations that prevent or predispose to development of a persistent metabolic disorders in adulthood [2,4].

Metabolic and inflammatory disorders may be related to the occurrence of metabolic syndrome and chronic diseases such as type 2 diabetes mellitus and cardiovascular diseases, which are among the leading causes of mortality worldwide [5,6]. Some adipokines and cytokines play an important role in metabolic disorders, like resistin, leptin, chemerin, adiponectin, TNF- α and IL-10 by attenuating or exacerbating the inflammatory process [7-12], and the visceral adipose tissue is the major proinflammatory cytokines promoter, due to accumulation of M1 macrophages. The chronic inflammation leads to metabolic repercussions such as insulin resistance, also the development of cardiovascular diseases [13,14]. This inflammatory state is perpetuated by oxidative stress [15]. Also, exacerbating reactive oxygen species (ROS) concentrations is related to cellular function loss and death, as well as lipid disorders [16]. In this way, liver is a key organ in the regulation of metabolic homeostasis, and lipid accumulation in hepatocytes promote inflammation, insulin resistance and endothelial dysfunction [17].

In this context, the study of aspects associated with metabolic programming are important for elaboration of health prevention strategies. Overnutrition (ON) and undernutrition (UN) models show different metabolic scenarios that may contribute to the development of metabolic and inflammatory disorders. However, data are still lacking to better understand the impact of these models during adulthood. Previous studies show that, in rodents, postnatal overnutrition results

in increased body weight, insulin and leptin levels, as well as changes in the lipid composition of cell membranes [4,18,19], while postnatal undernutrition results in increased NF- κ B expression and cardiovascular risk, as well as changes in leptin secretion and impaired reproductive performance [20-23]. In this way, our aim was evaluating the influence of early overnutrition and undernutrition on metabolic and inflammatory markers during adulthood.

MATERIALS AND METHODS

Animals, intervention and tissue collection

Twenty C57BL/6 mice, fifty females and five males aged between 45-55 days, were obtained from the animal care center of University Federal of Lavras (UFLA). All animal procedures were approved by the local ethical committee for animal research (CEUA-UFLA/002/2018). The animals were maintained according to the ethical guidelines of our institution, also had free access to water and standard chow (Presence®). Female mice were remained in groups of three animals per cage for fifteen days, for adaptation time. After this period, one male was placed into each female group for mating, for ten days. After this time, male was removed, and females remained together until the birth of offspring.

Two days after the birth, the litters were relocated to compose the experimental groups. To induce early postnatal overnutrition the original litter was reduced to 3-4 pups, forming the Overnutrition (ON) group. To induce early postnatal undernutrition, the opposite was performed, the original litter was increased to 15-16 pups forming the Undernutrition (UN) group. Litter containing 8-10 pups was used as Control (C) group. Only male mice were used in the study, and the procedure described was repeated until the desired number of mice was obtained for the experimental groups (C=8; ON=8; UN=6). After the weaning period, at postnatal day 21, both groups had free access to water and standard chow. The experimental design is shown in **Figure 1**.

Mice weight and food intake was measured once a week during the experimental time. Lee index was calculated according to the formula [$\sqrt[3]{\text{weight (g)}/ \text{nose-to-anus length (cm)}}$] [24]. At postnatal 120 days, the animals were submitted to 12 hours of fasting, anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and killed. The epididymal adipose tissue and liver were collected, weighed and stored at -20°C . The blood samples were collected for analysis, and serum were also stored at -20°C .

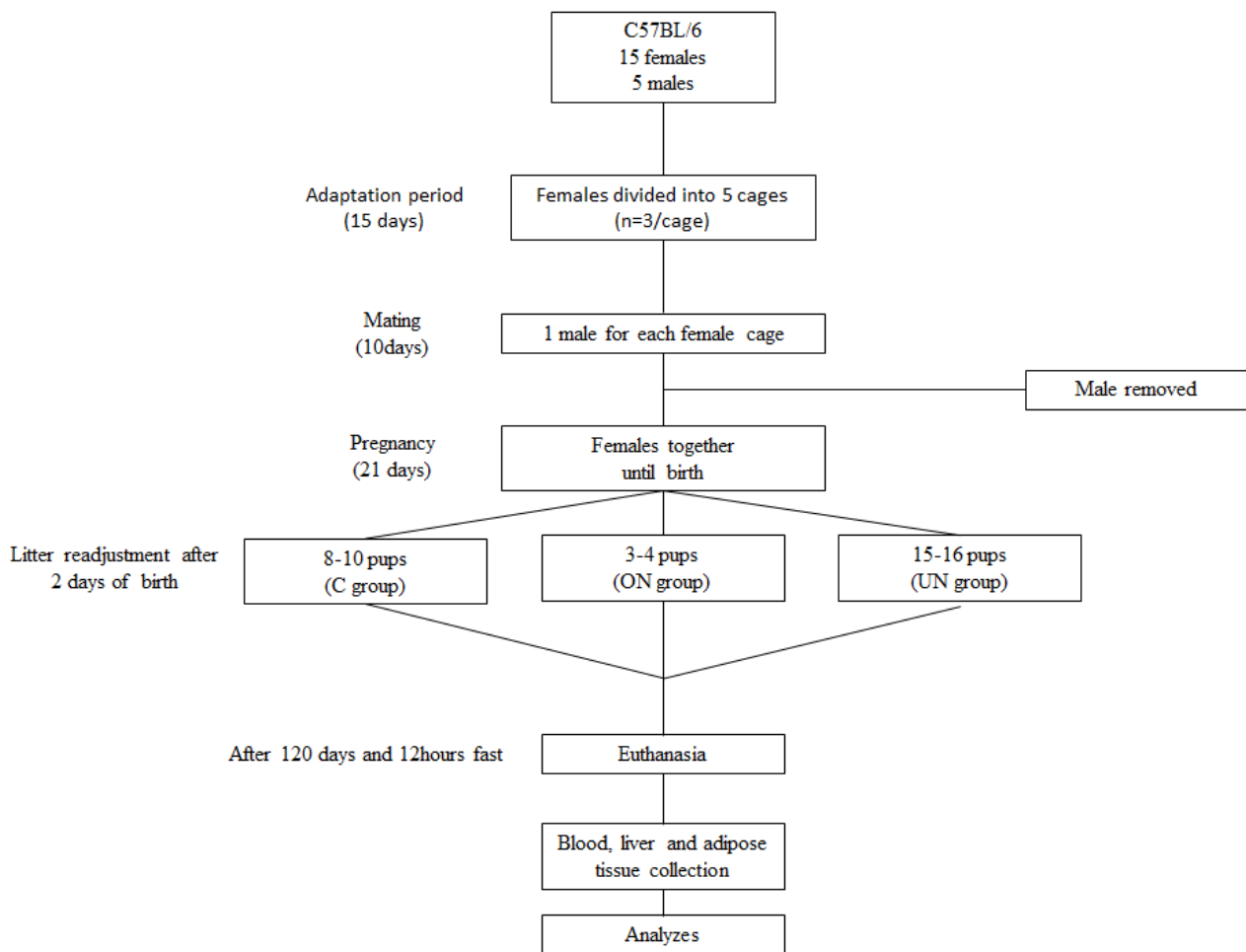


Figure 1 – Experimental design. Control group (C), overnutrition group (ON) and undernutrition group (UN).

Serum metabolic analysis

Fasting total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride and glucose levels were quantified by colorimetric kits (Labtest, Brazil). LDL-cholesterol was calculated according to the

Friedewald's formula $[(\text{triglycerides} / 5) + \text{HDL-c}] - \text{total cholesterol}$ [25]. Adiponectin, leptin, chemerin and resistin levels were assayed by ELISA (R&D systems, Europe Ltd., Abington, UK), according previous study [13].

ELISA assay in adipose tissue

TNF- α and IL-10 levels were measured in epididymal adipose tissue using DuoSet ELISA development kits (R&D System, Inc., Minneapolis, MN, USA). Firstly, samples of epididymal adipose tissue (50 mg/animal) were homogenized with 0,5 ml of cytokine extraction solution. The homogenate was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes at 4°C and the infranatant was collected to measure cytokine levels by ELISA. Samples were diluted in 0.1% bovine serum albumin (BSA) in proportion of 1:4 (tissue for BSA). The plates were sensitized with each capture antibody. After washing, samples were added and incubated overnight. Secondly, block solution was added, and sample wells were washed and incubated with the detection antibody for 2 h. Wells were again washed, and the streptavidin solution was added and incubated for 20 min. Subsequently, the wells were washed, and the substrate solution was added and incubated for 30 min. Stop solution was added immediately afterwards, and the absorbance was measured at 490 nm. This way of measuring cytokine concentrations in adipose tissue has been used in previous study [13,26].

Hepatic lipids content

Total hepatic lipids content were extracted by organic solvents according to Folch et al. [27]. Lipid extracts were dried overnight at 37°C, and total lipids quantified. After, lipid extracts were diluted in 500 mL of isopropanol. Total cholesterol and triglyceride levels were quantified by colorimetric kits (Labtest, Brazil).

Hepatic oxidative stress

Samples of hepatic tissue (100 mg/animal) were homogenized in phosphate buffer saline. The homogenate was centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C and the infranatant content was stored at -20°C. Lipid peroxidation was determined by Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) technique [28]. Hydroperoxide concentrations were determined according to Banerjee et al. [29]. Total protein content was determined by the Bradford's method [30]. Superoxide dismutase (SOD) activity was quantified by inhibition of auto-oxidation as absorbance at 550 nm [31]. Catalase (CAT) activity was measured by the rate of decrease in H₂O₂ at 240 nm according to Aebi's method [32].

Statistical analysis

Data were analyzed using GraphPadPrism version 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) and results were expressed as means ± SEM. All data were analyzed for normality by Kolmogorov-Smirnov test. Comparison between two groups was performed using Student's t test. Significance level adopted was p<0.05.

RESULTS

Postnatal overnutrition and undernutrition induce anthropometric alterations, tissue changes and promote metabolic dysfunctions in adulthood

After weaning, at postnatal 21 days, the ON group exhibited higher body weight than C group (p<0.001) while the UN group showed lower body weight (p<0.001). In adulthood, at 120 days, the ON group kept the body weight increased (p<0.01) while the UN group presented body weight similar than C group. The Lee index was no different between the ON and C groups, however, this group showed higher epididymal adipose tissue weight (p<0.0001). UN group exhibited smaller Lee index (p<0.05) and epididymal adipose tissue weight (p<0.05). Only UN

group presented changes in food intake being higher than C group between 7-9 weeks ($p<0.05$). Liver weight was increased in ON ($p<0.001$) and UN ($p<0.01$) groups (**Table 1**).

Table 1. Body weight (BW) at 21 and 120 days, Lee index, epididymal adipose tissue (EAT) weight, liver weight and food intake at 1-3, 4-6, 7-9 and 10-13 weeks from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups.

	C	ON	UN
BW at 21 days (g)	8.21±0.18	10.22±0.42*	5.28±0.66*
BW at 120 days (g)	24.73±0.21	26.13±0.33*	23.95±0.41
Lee index at 120 days	1.39±0.009	1.38±0.009	1.35±0.006*
EAT weight (mg/g of BW)	8.88±0.24	14.28±0.69*	7.48±0.57*
Liver weight (mg/g of BW)	38.70±1.05	47.4±0.93*	43.69±0.95*
Food intake at 1-3weeks (g)	17.35±2.64	19.40±1.72	15.95±2.72
Food intake at 4-6 weeks (g)	24.58±1.31	25.08±1.74	27.19±2.25
Food intake at 7-9 weeks (g)	24.29±0.82	25.08±0.99	31.12±3.17*
Food intake at 10-13 weeks (g)	23.66±0.36	23.61±1.51	24.91±0.89

The data represent means ± SEM of 6-8 mice per group. * $p<0.05$ versus control.

Blood serum analyzes revealed increased levels in fasting glucose ($p<0.01$), total cholesterol ($p<0.0001$) and LDL-cholesterol ($p<0.0001$) in ON than C group, while no difference was observed in HDL-cholesterol and triglyceride concentrations. The UN group exhibited lower HDL-cholesterol ($p<0.01$) and higher LDL-cholesterol ($p<0.05$) and triglyceride ($p<0.05$) levels compared to the C group, while not identified changes in glucose and total cholesterol concentrations. ON increased hepatic triglycerides levels ($p<0.001$), but no difference was found in total hepatic lipids content and hepatic cholesterol. In these same analyzes, UN group

showed higher total hepatic lipids content ($p<0.05$) and hepatic triglycerides concentration ($p<0.0001$) (**Table 2**).

Table 2. Fasting glucose and lipidic profile from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups.

	C	ON	UN
Serum parameters			
Glucose (mmol/L)	6.74±0.28	8.23±0.22*	6.88±0.22
Total cholesterol (mmol/L)	1.96±0.12	3.66±0.25*	1.97±0.12
LDL-cholesterol (mmol/L)	0.65±0.08	1.92±0.19*	0.96±0.10*
HDL-cholesterol (mmol/L)	1.30±0.12	1.08±0.11	0.66±0.11*
Triglycerides (mmol/L)	0.52±0.03	0.47±0.04	0.72±0.06*
Hepatic lipids			
Total lipids content (mg/g of liver)	30.7±2.36	34.1±0.74	42.2±4.52*
Cholesterol (mmol/L)	5.44±0.18	5.51±0.39	5.06±0.33
Triglycerides (mmol/L)	2.94±0.30	4.60±0.13*	8.91±0.58*

The data represent means ± SEM of 6-8 mice per group. * $p<0.05$ versus control.

Postnatal overnutrition and undernutrition alter inflammatory markers and induce oxidative stress in the liver

Serum adipokines (**Fig.2**) changed in both experimental groups compared to C group. ON model exhibited higher resistin (A) ($p<0.05$) and leptin (B) ($p<0.05$) levels while no differences were identified in chemerin (C) and adiponectin (D) concentrations. UN model showed higher

leptin level (B) ($p < 0.05$) and lower concentrations of resistin (A) ($p < 0.01$), chemerin (C) ($p < 0.01$) and adiponectin (D) ($p < 0.001$).

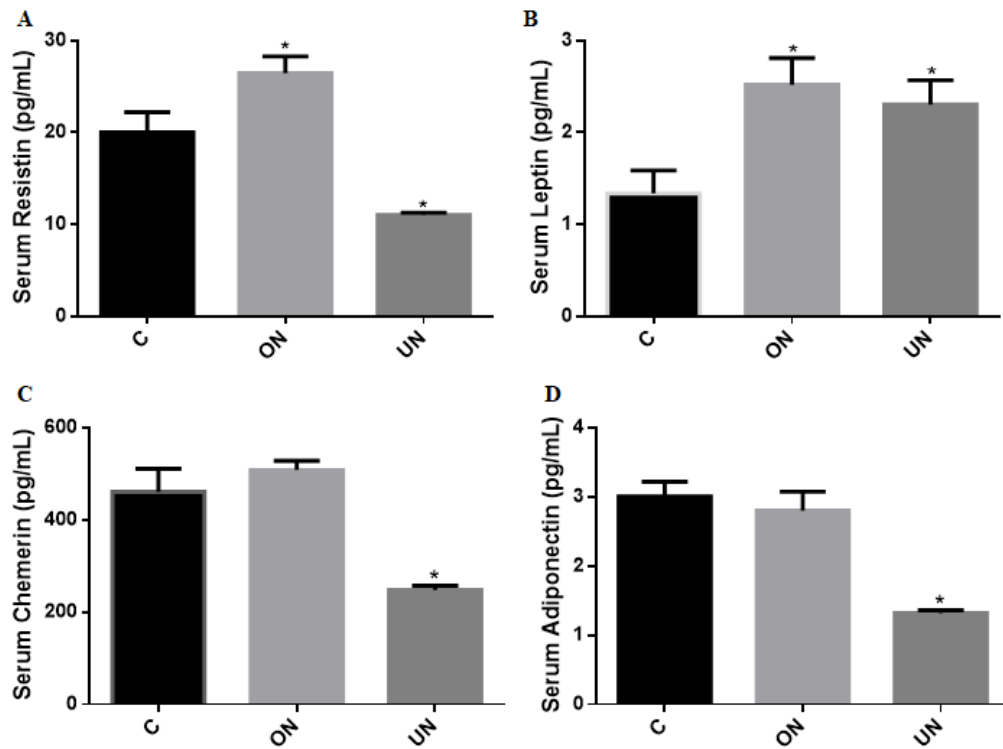


Figure 2- Serum adipokines. (A) Serum resistin (pg/mL), (B) serum leptin (pg/mL), (C) serum chemerin (pg/mL) and (D) serum adiponectin (pg/mL). Results from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups. * $P < 0.05$ versus control.

Both experimental models increased TNF- α levels ($p < 0.05$) and not modified IL-10 concentrations in epididymal adipose tissue compared to C group (**Fig. 3A and 3B, respectively**).

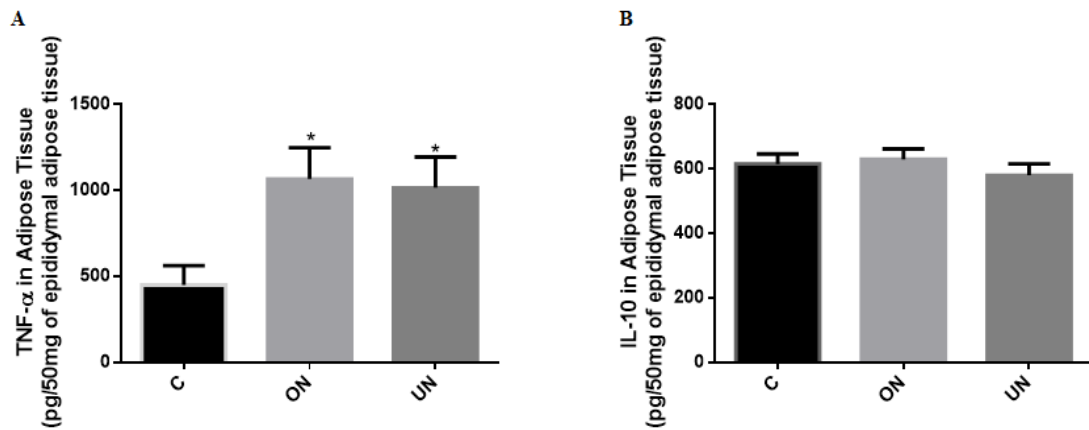


Figure 3 – Cytokines in adipose tissue. (A) TNF- α in epididymal adipose tissue (pg/mL), (B) IL-10 in epididymal adipose tissue (pg/mL). Results from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups. *P<0.05 vs control.

Liver oxidative stress (**Fig.4**) was induced by ON and UN models. TBARS concentrations (A) were higher in ON group (p<0.001) and UN group (p<0.01), and the same results were found in hydroperoxides levels (B) (p<0.05). CAT activity (C) was reduced in ON (p<0.01) and UN (p<0.05) groups, while both groups did not change SOD concentrations (D).

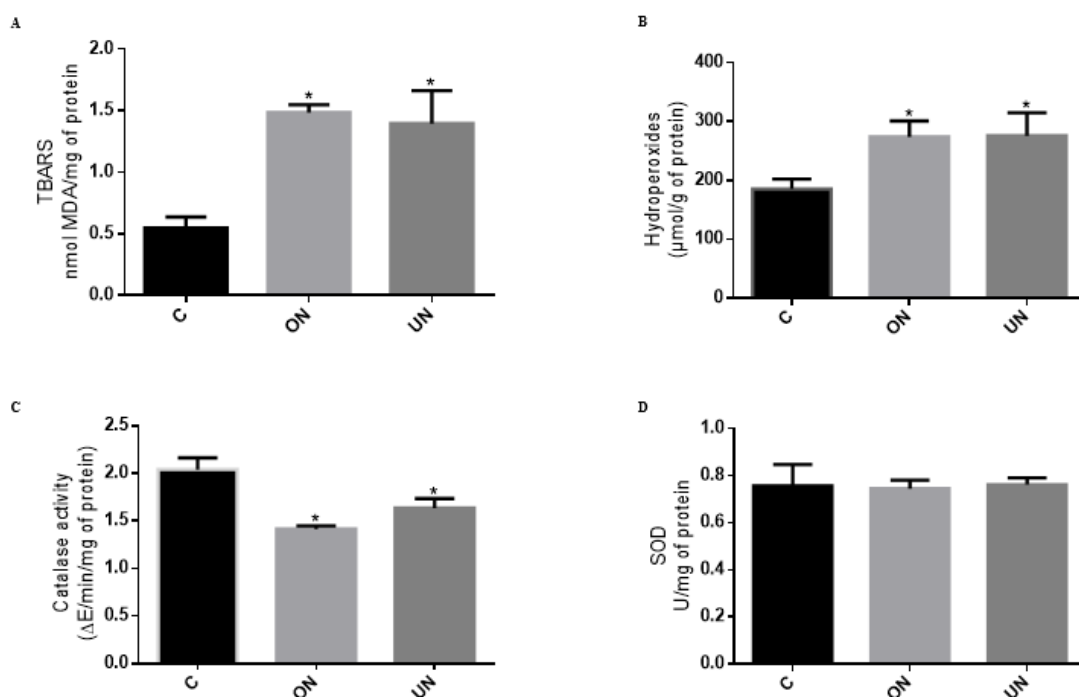


Figure 4- Hepatic oxidative stress. (A) Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) (nmolMDA/mg of protein), (B) hydroperoxides ($\mu\text{mol/mg}$ of protein), (C) catalase activity ($\Delta\text{E}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) and (D) superoxide dismutase (U/mg of protein). Results from control (C), overnutrition (ON) and undernutrition (UN) groups. * $P < 0.05$ versus control.

DISCUSSION

Our results demonstrate that postnatal overnutrition increased body weight early in life, and persisted throughout adulthood, while the undernutrition model presented lower body weight at weaning and control-like weight in adulthood, data already demonstrated in previous studies [4,22,33,34]. The overnutrition model showed control-like Lee index but increased epididymal adipose tissue, suggesting impairment in body composition due to higher fat accumulation. The expansion of adipose tissue promotes increased secretion of proinflammatory adipokines and cytokines, such as resistin and $\text{TNF}\alpha$, as well as stimulating the leptin resistance process [7,13,14, 35], and as expected, our results corroborate this evidence. The undernutrition model, however, exhibited lower Lee index and epididymal adipose tissue compared to control animals, but this body profile was also associated with metabolic and inflammatory dysfunctions. The mechanism by which this body profile is associated with metabolic and inflammatory disorders is unclear, however, Lacerda et al [26] demonstrated that adult mice that suffered a period of food restriction had increased adipose tissue inflammatory response, which contributed to the reduction in adipose mass, suggesting that inflammation associated with adipose tissue does not occur only in the expansion process. Although they did not show changes in IL-10 concentration, both groups showed an increase in $\text{TNF}\alpha$ concentration, suggesting that there is no condition of homeostasis.

The expansion of white adipose tissue is associated with the imbalance of cytokines and adipokines, causing metabolic disorders and cardiovascular diseases. This process occurs

through the dysregulation of adipogenesis, reduced angiogenesis and localized hypoxia, creating an environment of high cellular stress, thus, the physiological response to this stress is the release of inflammatory cytokines and chemokines, mainly the monocyte-1 chemoattracting protein (MCP-1) and TNF α , which recruit more inflammatory cells, perpetuating further the cycle of cellular stress and inflammation [36]. The increase in TNF α concentration, as observed in our study, is strongly related to impaired glucose metabolism, because this cytokine can alter the insulin signaling pathway by phosphorylation on serine residues in the IRS-1, resulting in lower glucose uptake by cells and increased blood glucose [10]. Although our study did not evaluate insulin concentration in animals, the increase in glycemia in the overnutrition model suggest a possible insulin resistance, which is associated with changes in serum lipid profile, such as increase in total cholesterol and LDL. In hyperinsulinemia, there is an increase in the rate of lipolysis and a reduction in the rate of lipogenesis by adipose tissue, resulting in increased levels of free fatty acids and cholesterol [8,36]. The undernutrition model showed no glycemic alteration, however, an increase in TNF α concentration suggest damage in the serum lipid profile, since this cytokine has lipolytic activity and consequently leads to higher fat deposition in hepatocytes [36]. The liver is a key organ in the regulation of metabolic homeostasis, and excessive fat accumulation in hepatocytes is associated with increased serum levels of fatty acids and de novo lipogenesis, contributing to the higher cardiovascular risk profile [17]. Alterations in the insulin signaling pathway in the liver are extensively studied in the hepatic steatosis process. First, hepatic expression of IRS-2 is downregulated in animal models, contributing to the increase in gluconeogenesis, due to the impairment in the downregulation of glucose-6 -phosphatase (G6Pase) and phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK). In addition, insulin signaling through the hepatic lipogenic pathway is not suppressed, contributing to the excessive accumulation of fat [37].

The increase in resistin and leptin concentrations, shown by the overnutrition model, are also related to the maintenance of the inflammatory state and increase of serum glucose and cholesterol concentrations, contributing to the higher risk of developing cardiovascular disease [7,8]. Chemerin is also associated with increased adiposity and changes in lipid parameters, being considered an early marker of the development of metabolic syndrome [7,9]. Our study did not identify alteration in serum chemerin concentration in the overnutrition model; however, to the best of our knowledge, this is the first time this adipokine is evaluated in a reduced litter model. The undernutrition model showed a reduction in serum adiponectin concentration, a fact that contributes to the metabolic dysfunctions found, since this adipokine acts to improve the fat oxidation process and glucose uptake by muscles [7]. However, the undernutrition model also showed a reduction in serum concentrations of resistin and chemerin. Although it is known that increased secretion of these adipokines are associated with adipose tissue expansion [35], it was not possible to clarify if the lower concentrations of resistin and chemerin were consequence of the lower adiposity found in our data. Both models showed increased hepatic concentration of oxidative stress markers. This increase may be associated with higher accumulation of triglycerides in hepatocytes, while this process results in the perpetuation of the systemic inflammatory state and fibrogenesis of the liver tissue [15]. The antioxidant defense enzyme system acts to protect the body against disorders caused by the excessive reactive oxygen species. Both experimental groups exhibited lower catalase activity, enzyme responsible for hydrogen peroxide neutralization, resulting in the exacerbation of oxidative stress [38]. However, SOD concentrations were unchanged, suggesting that there is no impairment in action of this enzyme against superoxide radicals [38].

Our results reinforce the importance of adequate nutritional status in early life, as the dietary modulation that occurred exclusively during the lactation period was able to cause persistent metabolic and inflammatory disorders in adulthood, despite the fact that the animals have eaten

a balanced diet throughout of life. In addition, the undernutrition model shows the importance of paying attention to the metabolic programming even when individuals do not have increased weight and body fat, which is commonly associated with metabolic and inflammatory disorders. Many issues involving metabolic programming, including the epigenetic mechanisms by which it happens, need to be elucidated which reinforces the importance of studies on this topic.

CONCLUSION

Our results demonstrate that postnatal overnutrition and undernutrition models caused important metabolic and inflammatory disorders, such as changes in glycemic and lipidic profiles, increased hepatic oxidative stress, and presented a pro-inflammatory profile of cytokines and adipokines, as well as these disorders were persistent during adulthood.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge the undergraduate students and our laboratory technician for assistance in the animal care and laboratory analysis. This research was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

CONFLICT OF INTEREST

None.

REFERENCES

[1] HANLEY, Bryan et al. Metabolic imprinting, programming and epigenetics – a review of present priorities and future opportunities. *British Journal Of Nutrition*, [s.l.], v. 104, n. 1, p.1-

25, jul. 2010. Cambridge University Press (CUP).

<http://dx.doi.org/10.1017/s0007114510003338>.

[2] BLOCK, Tomaz; EL-OSTA, Assam. Epigenetic programming, early life nutrition and the risk of metabolic disease. *Atherosclerosis*, [s.l.], v. 266, p.31-40, nov. 2017. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2017.09.003>.

[3] LEVIN, Barry e. Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis. *Philosophical Transactions Of The Royal Society B: Biological Sciences*, [s.l.], v. 361, n. 1471, p.1107-1121, 29 jul. 2006. The Royal Society.

<http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2006.1851>

[4] GUILLOTEAU, P. et al. Adverse Effects Of Nutritional Programming During Prenatal And Early Postnatal Life, Some Aspects Of Regulation And Potential Prevention And Treatments. *Journal Of Physiology And Pharmacology*, [s.i.], v. 3, n. 60, p.17-35, mar. 2009.

[5] GRUNDY, Scott M. et al. Diagnosis and Management of the Metabolic Syndrome: An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*, [s.i.], v. 4, n. 112, p.2735-2752, out. 2005.

[6] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. The top 10 causes of death. 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>>.

Acesso em: 01 nov. 2019.

[7] ABELLA, Vanessa et al. Adipokines, Metabolic Syndrome and Rheumatic Diseases. *Journal Of Immunology Research*, [s.l.], v. 2014, p.1-14, 2014. Hindawi Limited.

<http://dx.doi.org/10.1155/2014/343746>.

[8] KUMARI, Reena et al. An update on metabolic syndrome: Metabolic risk markers and adipokines in the development of metabolic syndrome. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, [s.l.], v. 13, n. 4, p.2409-2417, jul. 2019. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dsx.2019.06.005>

- [9] SINGH, Anusha et al. Adiponectin and Chemerin: Contrary Adipokines in Regulating Reproduction and Metabolic Disorders. *Reproductive Sciences*, [s.l.], v. 25, n. 10, p.1462-1473, 18 abr. 2018. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/1933719118770547>.
- [10] YARIBEYGI, Habib et al. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *Journal Of Cellular Physiology*, [s.i], v. [], n. [], p.1-10, set. 2018.
- [11] RUIZ-CANELA, Miguel; BES-RASTROLLO, Maira; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, Miguel. The Role of Dietary Inflammatory Index in Cardiovascular Disease, Metabolic Syndrome and Mortality. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 17, n. 8, p.1265-1281, 3 ago. 2016. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms17081265>.
- [12] SRIKANTHAN, Krithika et al. Systematic Review of Metabolic Syndrome Biomarkers: A Panel for Early Detection, Management, and Risk Stratification in the West Virginian Population. *International Journal Of Medical Sciences: International Journal of Medical Sciences*, [s.i], v. 1, n. 13, p.25-38, jan. 2016.
- [13] MARTINS, LaísBhering. et al. Paradoxical role of tumor necrosis factor on metabolic dysfunction and adipose tissue expansion in mice. *Nutrition*, v. 50, p.1-7, jun. 2018.
- [14] MAGRONE, Thea.; JIRILLO, Emilio. Childhood obesity: immune response and nutritional approaches. *Frontiers in Immunology*, v. 6, p. 1 – 13, 2015.
- [15] MARSEGLIA, Lucia. et al. Oxidative stress in obesity: A critical component in human diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, p. 378 – 400, 2015. [16] DÍAZ-CASADO, Helena M. et al. The Paradox of Coenzyme Q10 in Aging. *Nutrients*, [s.l.], v. 11, n. 9, p.2221-2244, 14 set. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/nu11092221>.
- [17] DINANI, Amreen; SANYAL, Arun. Nonalcoholic fatty liver disease. *Cardiovascular Endocrinology*, [s.l.], v. 6, n. 2, p.62-72, jun. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/xce.0000000000000126>.

- [18] HABBOUT, Ahmed et al. Postnatal Overfeeding in Rodents by Litter Size Reduction Induces Major Short- and Long-Term Pathophysiological Consequences. *The Journal Of Nutrition*, [s.l.], v. 143, n. 5, p.553-562, 27 fev. 2013. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.3945/jn.112.172825>.
- [19] PLAGEMANN, A et. al. A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation. *Journal of Maternal Fetal and Neonatal Medicine*, v. 21, n. 3, p. 143-8, 2008.
- [20] MORAIS, Natália Gomes de et al. Impact of neonatal malnutrition on expression TLR-9, NF-kB and cytokines of macrophages infected in vitro with methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbial Pathogenesis*, [s.l.], v. 132, p.254-260, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2019.05.009>.
- [21] VISKER, J. R.; FERGUSON, D. P.. Postnatal undernutrition in mice causes cardiac arrhythmogenesis which is exacerbated when pharmacologically stressed. *Journal Of Developmental Origins Of Health And Disease*, [s.l.], v. 9, n. 4, p.417-424, 12 abr. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/s2040174418000156>.
- [22] CARON, Emilie et al. Alteration in Neonatal Nutrition Causes Perturbations in Hypothalamic Neural Circuits Controlling Reproductive Function. *Journal Of Neuroscience*, [s.l.], v. 32, n. 33, p.11486-11494, 15 ago. 2012. Society for Neuroscience. <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.6074-11.2012>.
- [23] REMMERS, Floor; FODOR, Mariann; WAAL, Henriette A. Delemarre-van de. Neonatal food restriction permanently alters rat body dimensions and energy intake. *Physiology & Behavior*, [s.l.], v. 95, n. 1-2, p.208-215, set. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2008.05.021>.
- [24] NOVELLI, e L B et al. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Laboratory Animals*, [s.l.], v. 41, n. 1, p.111-119, jan. 2007. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1258/002367707779399518>.

- [25] FRIEDEWALD WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* [Internet]. 1972 Jun [cited 2019 Jul 17];18(6):499–502.
- [26] LACERDA, Débora Romualdo et al. Role of adipose tissue inflammation in fat pad loss induced by fasting in lean and mildly obese mice. *The Journal Of Nutritional Biochemistry*, [s.l.], v. 72, p.108208-108216, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.06.006>.
- [27] FOLCH J, Lees M, Sloane Stanley Gh. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* [Internet]. 1957 May [cited 2019 Jul 17];226(1):497–509.
- [28] WALLIN B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein Oxidation and Measurement of Thiobarbituric Acid Reacting Substances Formation in a Single Microtiter Plate: Its Use for Evaluation of Antioxidants. *Anal Biochem* [Internet]. 1993 Jan [cited 2019 Jul 17];208(1):10–5.
- [29] BANERJEE D, Kumar PA, Kumar B, Madhusoodanan UK, Nayak S, et al. Determination of absolute hydrogen peroxide concentration by spectrophotometric method. *Curr Sci* [Internet]. 2002 [cited 2019 Jul 17];83(10):1193–4.
- [30] BRADFORD M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem* [Internet]. 1976 May 7 [cited 2019 Jul 17];72(1–2):248–54.
- [31] BANNISTER, Joe V.; CALABRESE, Lilia. Assays for Superoxide Dismutase. *Methods Of Biochemical Analysis*, [s.l.], p.279-312, 31 out. 2006. John Wiley & Sons, Inc..<http://dx.doi.org/10.1002/9780470110539.ch5>.
- [32] AEBI, H. [13] Catalase in vitro. *Methods Enzymol* [Internet]. 1984 Jan 1 [cited 2019 Jul 17];105:121–6.

- [33] XIAO, Xiao Qiu et al. Excess Weight Gain during the Early Postnatal Period Is Associated with Permanent Reprogramming of Brown Adipose Tissue Adaptive Thermogenesis. *Endocrinology*, [s.l.], v. 148, n. 9, p.4150-4159, set. 2007. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0373>.
- [34] REILLY, Shannon M.; SALTIEL, Alan R.. Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature Reviews Endocrinology*, [s.l.], v. 13, n. 11, p.633-643, 11 ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2017.90>.
- [36] ATAWIA, Reem T. et al. Mechanisms of obesity-induced metabolic and vascular dysfunctions. *Frontiers In Bioscience*, [n.], v. 24, n. [], p.890-934, 10 ago. 2019.
- [37] HONMA, Midori; et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *International Journal Of Obesity*, [s.l.], v. 42, n. 9, p. 1544-1555, 1 maio 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41366-018-0062-9>.
- [38] POWERS, Scott K.; JACKSON, Malcolm J. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiological Reviews*, [s.l.], v. 88, n. 4, p.1243-1276, out. 2008. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00031.2007>.

ANEXO I

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Cx.P.3037 - Lavras – MG – 37200-000 – (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação do óleo de peixe na modulação de parâmetros metabólicos, inflamatórios e teciduais em modelo de obesidade por hiperalimentação pós-natal em camundongos C57BL6", protocolo nº 002/18, sob a responsabilidade de Laura Cristina Jardim Pôrto Pimenta, Isabela Coelho de Castro, Isabela Queiroz Perígolo Lopes, Érika da Silva Rosa, Gláucia Ferreira Andrade Vilas Boas e Vânia Chaves de Figueiredo, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em reunião de 14/03/2018.

Vigência da autorização: de 01/04/2018 a 31/12/2021

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Camundongo isogênico / C57BL6

Número de animais aprovados: 40

Peso/Idade: 30-40 g / 45-55 dias

Sexo: macho e fêmea

Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): Biotério Central Multiusuário da UFLA - Chefe: Thales Augusto Barçante - Coordenadora: Profª Christiane Malfitano



Prof. Juliano Vogas Peixoto
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 – Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br