

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM
FARINHA DE FEIJÃO BRANCO (*Phaseolus vulgaris*
L.) SOBRE O METABOLISMO DE RATOS OBESOS
INDUZIDOS POR SUPERALIMENTAÇÃO
PRECOCE**

ESTER VIEIRA ALVES

Sinop, Mato Grosso
Agosto, 2022

ESTER VIEIRA ALVES

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM
FARINHA DE FEIJÃO BRANCO (*Phaseolus vulgaris*
L.) SOBRE O METABOLISMO DE RATOS OBESOS
INDUZIDOS POR SUPERALIMENTAÇÃO
PRECOCE**

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso, *Campus* Universitário de Sinop, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências em Saúde.

Sinop, Mato Grosso
Agosto, 2022

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

V658e Vieira Alves, Ester.

Efeito da suplementação dietética com farinha de feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre o metabolismo de ratos obesos induzidos por superalimentação precoce / Ester Vieira Alves. -- 2022

103 f. : il. color. ; 30 cm.

Orientador: Julio Cezar de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Alimentos Funcionais. 2. Obesidade Infantil. 3. Supernutrição Precoce. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS EM SAÚDE

FOLHA DE APROVAÇÃO

TÍTULO : "Efeito da suplementação dietética com farinha de feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre o metabolismo de ratos obesos induzidos por superalimentação precoce"

AUTOR : Mestranda Ester Vieira Alves

Dissertação defendida e aprovada em 31/08/2022.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Presidente Banca / Orientador Doutor(a) Júlio Cezar de Oliveira

Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

2. Examinador Interno Doutor(a) Renata de Azevedo Melo Luvizotto Nascimento

Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

3. Examinador Externo Doutor(a) Ananda Malta Lourenzon

Instituição : Universidade Estadual de Maringá - UEM

4. Examinador Suplente Doutor(a) Veridiana Mota Moreira Lima

Instituição : UNEMAT

5. Examinador Suplente Doutor(a) EVELINE APARECIDA ISQUIERDO FONSECA DE QUEIROZ

Instituição : UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

SINOP, 31/08/2022.



Documento assinado eletronicamente por **RENATA DE AZEVEDO MELO LUVIZOTTO NASCIMENTO**, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso, em 01/09/2022, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **JULIO CEZAR DE OLIVEIRA**, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso, em 13/09/2022, às 11:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ananda Malta Lourenzon**, Usuário Externo, em 16/09/2022, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **5037482** e o código CRC **682B0937**.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao meu esposo Wemerson que esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e incentivando! Você é meu orgulho!

Ao meu filho Thales que mesmo sem entender têm mudado minha vida, me proporcionando momentos especiais! Te amo!

A minha irmã Marta por me apoiar e dar um suporte para que eu conseguisse levar até o fim minha pesquisa! Meu muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pela oportunidade de ter conhecimento e ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais, Elizeu e Maria, por terem me ensinado dar valor aos estudos e por querer sempre o meu melhor.

Aos meus irmãos, Miriã, Elias e Marta que sempre estiveram comigo na torcida.

Agradeço a todo o restante da minha família que sempre torceram pelo meu sucesso! Amo todos vocês.

Ao meu orientador, professor Dr. Júlio Cezar de Oliveira por me ter acolhido no grupo de pesquisa “Programação Perinatal de Doenças Metabólicas: conceito DOHaD”, por todos os momentos que com paciência têm transmitido um pouco de sua experiência ao longo desses dois anos e meio, estando sempre disposto a ajudar me apoiando nos momentos mais difíceis, o senhor é muito especial e levarei comigo esses ensinamentos. Gratidão!

Obrigada por todo apoio, pelos momentos de risadas e amizade às minhas colegas de pesquisa, Camila, Ingridys e Suéllen.

Aos alunos de iniciação científica que me apoiaram ao longo desse experimento, possibilitando que o trabalho fosse executado, em especial à minha Prima Tatiane, que foi meu braço direito até ao fim, não mediu esforços e essa conquista com certeza foi com seu excelente trabalho e amor dispensados com os animais, minha veterinária preferida!

Em especial à Dra Alexandra Secreti Prevedello por ter me apresentado ao meu orientador e ter me apoiado para que meu sonho se concretizasse.

À Universidade Federal de Mato Grosso, bem como também aos professores do Programa de Pós-Graduação Ciências em Saúde (PPGCS) pelos conhecimentos e ensinamentos compartilhados.

A todos os secretários, Eliane, Amarildo e Maelbe, pela atenção na pós-graduação. Aos técnicos de laboratório Cleberson, Larissa e Morenna sempre pacientes em nos orientar e informar como tudo deveria ser feito. Aos guardinhas que estavam sempre solícitos para nos atender na ala do NUPADS da faculdade.

Aos animais que tornaram possível a realização do trabalho cedendo suas vidas para a ciência.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMAT, pelo apoio financeiro com a bolsa de estudos.

Enfim agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a construção dessa dissertação, sendo uma etapa importante para minha vida profissional. Obrigada por tudo!

EPIGRAFE

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

George Bernard Shaw

RESUMO

O uso de alimentos funcionais vem sendo grandemente aplicado como ferramenta de intervenção preventiva ao desenvolvimento de doenças metabólicas. Objetivamos investigar o efeito da dieta suplementada com farinha do feijão branco (*Phaseolus vulgaris L.*) sobre a composição corporal e homeostase glicêmica e responsividade central à insulina, em ratos metabolicamente programados por obesidade induzida precocemente, por meio de redução de ninhada durante lactação. Ao terceiro dia de vida, as ninhadas foram padronizadas para 3 filhotes por mãe lactante (grupo NR), enquanto o grupo controle foi ajustado para 8 filhotes por mãe lactante (grupo NP). Ao 12º dia de lactação, coletou-se amostras de leite e aos 6º, 11º e 16º, aferiu-se a ingestão de leite pelos filhotes. Ao desmame (22º dia de vida), cada grupo foi subdividido em dois subgrupos: grupos NP-DP e NR-DP, alimentados com dieta padrão para roedores, e grupos NP-FB e NR-FB alimentados com dieta padrão para roedores suplementada com 2,5% de farinha de feijão branco (FB), desde o desmame até a vida adulta. Durante todo o período experimental o ganho de peso, a ingestão alimentar e hídrica dos animais foram aferidas a cada dois dias. Quando adultos, após os 95 dias de vida, todos os grupos foram submetidos ao teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT), teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT) e submetidos a injeção intracerebroventricular (icv) de insulina. Aos 100 dias de vida, os ratos foram eutanasiados para remoção de amostras teciduais (tecido adiposo branco e marrom, e músculo esquelético), para avaliação biométrica; bem como coleta sanguínea para posterior avaliações bioquímicas e hipotálamo para a quantificação de marcadores inflamatórios. Em relação ao leite das ratas NP, observou-se aumento nos níveis de glicose (41,02%), triglicerídeos (14,24%), colesterol total (16,66%), teor de gordura (48,88%) e conteúdo energético (42,87%) no leite das ratas NR ($P < 0,05$). Durante a lactação, os ratos NR apresentaram aumento de 16,64% no ganho de peso corporal, e maior ingestão de leite, em comparação aos ratos NP ($P < 0,001$). Ao longo do período pós desmame, os ratos NR mostraram-se 7,78% mais pesados do que os ratos NP ($P < 0,05$) e a suplementação da dieta com FB foi capaz de impedir esse ganho de peso corporal. Em relação aos ratos NP-DP, os animais do grupo NR-DP apresentaram fenótipo obeso, hiperfagia, hiperglicemia, dislipidemia, intolerância à glicose e resistência central e periférica à insulina ($P < 0,05$). Por outro lado, esse quadro de disfunção metabólica não foi observado no grupo NR-FB. Quanto aos marcadores pró-inflamatórios hipotalâmicos, os ratos NR-DP apresentaram níveis elevados de TNF- α (47,52%; $P < 0,01$), IL-1 β (43,21%; $P < 0,01$), e IL-6 (85,61%; $P < 0,001$) em relação aos NP-DP. Já, em relação aos ratos NR-DP, os ratos NR-FB, apresentaram redução em todas essas citocinas. Concluímos que a suplementação com a farinha do feijão branco foi capaz de impedir o desenvolvimento de obesidade (acúmulo dos depósitos de gordura visceral), bem como de melhorar a homeostase glicêmica e insulinêmica, atenuando o processo inflamatório hipotalâmico em ratos oriundos de ninhada reduzida.

Palavras-chave: alimentos funcionais; obesidade infantil; supernutrição precoce.

ABSTRACT

The use of functional foods has been widely applied as a tool for preventive intervention in the development of metabolic diseases. We aimed to investigate the effect of a diet supplemented with white bean flour (*Phaseolus vulgaris* L.) on body composition, glucose homeostasis and central insulin responsiveness in rats metabolically programmed for early obesity induced by litter reduction during lactation. At day 3 of life, litters were standardized to 3 pups per lactating mother (NR group), while the control group was adjusted to 8 pups per lactating mother (NP group). At day 12 of lactation, milk samples were collected and at days 6, 11 and 16, the milk intake of the pups was measured. At weaning (day 22 of life), each group was subdivided into two subgroups: NP-DP and NR-DP groups, fed a standard rodent diet, and NP-FB and NR-FB groups, fed a standard rodent diet supplemented with 2.5% white bean meal (FB) from weaning to adulthood. Throughout the experimental period the epso gain, food and water intake of the animals were measured every other day. As adults, after 95 days of age, all groups underwent intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT), intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT), and underwent intracerebroventricular (icv) injection of insulin. At 100 days of age, the rats were euthanized for removal of tissue samples (white and brown adipose tissue, and skeletal muscle), for biometric evaluation; as well as blood collection for further biochemical evaluations and hypothalamus for the quantification of inflammatory markers. In relation to the milk of the NP rats, an increase in the levels of glucose (41.02%), triglycerides (14.24%), total cholesterol (16.66%), fat content (48.88%) and energy content (42.87%) was observed in the milk of the NR rats ($P<0.05$). During lactation, NR rats showed 16.64% increase in body weight gain, and higher milk intake, compared to NP rats ($P<0.001$). Over the post-weaning period, NR rats were 7.78% heavier than NP rats ($P<0.05$), and supplementation of the diet with FB was able to prevent this body weight gain. Compared to the NP-DP rats, the animals in the NR-DP group showed an obese phenotype, hyperphagia, hyperglycemia, dyslipidemia, glucose intolerance, and central and peripheral insulin resistance ($P<0.05$). On the other hand, this picture of metabolic dysfunction was not observed in the NR-FB group. As for hypothalamic pro-inflammatory markers, NR-DP rats showed elevated levels of TNF- α (47.52%; $P<0.01$), IL-1 β (43.21%; $P<0.01$), and IL-6 (85.61%; $P<0.001$) relative to NP-DP. Where as, compared with NR-DP rats, NR-FB rats, showed a reduction in all these cytokines. We conclude that supplementation with white bean flour was able to prevent the development of obesity (accumulation of visceral fat deposits), and increase lean body mass, as well as to improve glycemic and insulinemic homeostasis and attenuate the hypothalamic inflammatory process in rats from a reduced litter size.

Keywords: functional foods; childhood obesity; early overfeeding.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Etapas de confecção de ração acrescida de farinha de feijão branco a 2,5%.	29
FIGURA 2. Evolução ponderal (A), ingestão alimentar (B) e hídrica (C) de mães durante gestação e lactação.....	37
FIGURA 3. Evolução ponderal (A) E Comportamento alimentar (B) durante a lactação.	39
FIGURA 4. Evolução ponderal (A), ingestão alimentar (C) e hídrica (E) da prole após o desmame.	41
FIGURA 5. Ingestão alimentar durante o teste de preferência alimentar (dieta padrão versus dieta padrão acrescida com farinha de feijão branco).	42
FIGURA 6. Ingestão alimentar em resposta a ação intracerebroventricular da insulina.43	
FIGURA 7. Efeito da dieta suplementada com feijão sobre parâmetros bioquímicos da prole adulta. (A) glicose, (B) triglicérides, (C) índice TyG, (D) colesterol total, (E) colesterol HDL, (F) colesterol VLDL.	45
FIGURA 8. Homeostase glicêmica-insulinêmica através dos testes de tolerância à glicose (ipGTT, A) e insulina (ipITT, B).	46
FIGURA 9. Marcadores inflamatórios hipotalâmicos.....	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1.	Obesidade	14
1.2.	Insultos perinatais como origem para o desenvolvimento da obesidade.....	16
1.3.	Redução de ninhada como modelo para desenvolvimento de obesidade por superalimentação precoce	18
1.4.	Regulação central da ingestão alimentar.....	19
1.5.	Citocinas próinflamatórias e anti-inflamatórias na obesidade	20
1.6.	Dieta funcional e/ou alimentos bioativos contra a obesidade	21
2	OBJETIVOS	24
2.1.	Geral	24
2.2.	Específicos.....	24
3	MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1.	Animais, condições de criação e experimentação	25
3.2	Acasalamento e detecção de prenhez	25
3.3	Modelo experimental de obesidade por superalimentação precoce.....	25
3.4	Ordenha do leite	27
3.5	Crematócrito do leite.....	27
3.6	Avaliação da ingestão de leite pela prole.....	28
3.7	Preparo da dieta suplementada com farinha de feijão branco.....	28
3.8	Análise da composição centesimal das dietas.....	29
3.9	Teste de preferência alimentar.....	30
3.10	Implante de cânulas-guia por cirurgia estereotáxica	30
3.11	Avaliação intracerebroventricular (icv) da ação da insulina na prole adulta	31
3.12	Comportamento alimentar	32
3.13	Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica	32
3.14	Parâmetros biométricos e composição corporal da prole adulta.....	33
3.15	Parâmetros bioquímicos.....	33
3.16	Dosagem hipotalâmica de marcadores inflamatórios	34
3.17	Análise estatística.....	35
4	RESULTADOS	36
4.1.	Peso corporal, ingestão alimentar e consumo hídrico de ratas gestantes e lactantes....	36
4.2.	Parâmetros bioquímicos e composição do leite materno	37

4.3. Evolução ponderal e comportamento alimentar durante lactação	38
4.4. Evolução ponderal, ingestão alimentar e hídrica da prole após o desmame	39
4.5. Preferência alimentar	41
4.6. Responsividade central à insulina, efeito sobre a ingestão alimentar	42
4.7. Parâmetros bioquímicos e homeostase glicêmica	43
4.8. Parâmetros biométricos da prole adulta	47
4.9. Avaliação dos marcadores inflamatórios hipotalâmicos	47
5 DISCUSSÃO	49
6 CONCLUSÃO	54
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
8 ARTIGO	67
ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética	102

1 INTRODUÇÃO

1.1. Obesidade

A obesidade é considerada uma doença crônica, apresentando etiologia multifatorial e associada com alterações biológicas, genéticas e psicológicas, bem como com fatores sociais, econômicos, culturais, e emocionais, que podem afetar direta ou indiretamente mecanismos regulatórios do metabolismo (LANDSTROM *et al.*, 2009).

A cada ano, a obesidade tem alcançado taxas incontornáveis, se tornando uma das maiores ameaças nutricionais na América Latina e Caribenha (OPAS, 2018). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a obesidade é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo (WHO, 2021).

No Brasil, o panorama não é diferente, alguns levantamentos apontam que mais de 55% da população está acima do peso. No último levantamento realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2008-2009, constatou-se que na região Centro-Oeste (MT, MS, GO, DF) 48,3% dos indivíduos adultos estão com excesso de peso (ABESO, 2022).

Acúmulo anormal ou excessivo de gordura pode prejudicar a saúde levando ao sobrepeso e obesidade, causado por um desequilíbrio energético prolongado entre o consumo e o gasto calórico (WHO, 2021). O consumo exagerado de alimentos hipercalóricos, ricos em gordura e açúcares, associado a uma redução na prática de atividade física, resultante da natureza cada vez mais sedentária de muitas formas de trabalho, e com novos meios de transporte devido à crescente urbanização, são fatores que contribuem de modo acentuado para o acelerado crescimento desse problema, em todo o mundo (WHO, 2021).

O índice de massa corporal (IMC) é comumente usado para classificar o sobrepeso e a obesidade em adultos. É definido como o peso de uma pessoa em quilogramas dividido pelo quadrado de sua altura, em metros (kg/m^2), sendo a medida populacional mais útil de sobrepeso e obesidade, para ambos os sexos e para todas as idades dos adultos, já para as crianças e adolescentes de 2 a 18 anos, recomenda-se o uso de uma escala de percentil, onde a idade e o sexo da criança também devem ser considerados (APOVIAN, 2016). Em adultos, um IMC de 25,0 a 29,9 kg/m^2 é definido como excesso de peso e um IMC de 30 kg/m^2 ou superior é definido como obeso. Já nas

crianças o sobrepeso é definido como um IMC no percentil 85 a 94, e a obesidade com um IMC igual ou acima do percentil 95 (APOVIAN, 2016).

Em 2016, a prevalência mundial era de mais de 1,9 bilhão de adultos com 18 anos ou mais com sobrepeso e destes, 650 milhões eram obesos, já em relação às crianças e adolescentes de 5 a 19 anos, houve um aumento drástico de 4% em 1975 para mais de 18% em 2016 (WHO, 2021).

O tecido adiposo armazena uma grande quantidade de gordura através das células adipócitas, sendo que são as únicas células a acumular lipídeos na forma de triglicerídeos em seu citoplasma, nos quais os adipócitos têm a capacidade de sintetizar ácidos graxos (lipogênese), estocando triglicerídeos quando há uma grande ingestão de calorias e promovendo lipólise quando há déficit calórico (ROSEN; SPIEGELMAN, 2014).

O tecido adiposo é dividido de acordo com suas funções biológicas como tecido adiposo branco (TAB), tecido adiposo marrom (TAM) e o mais recentemente descoberto, tecido adiposo bege, também conhecido como tecido adiposo marrom induzível. O TAB promove proteção contra choques mecânicos, é isolante térmico, armazena energia e tem papel endócrino secretando adipocitocinas. Já o TAM têm papel na termogênese, regulando a produção de calor e temperatura corporal (SCHERER, 2006; VISHVANATH; GUPTA, 2019). No entanto o tecido adiposo bege apresenta dupla função, comporta-se como o branco, armazenando o excesso de energia ou, quando estimulado (exposição ao frio, estimulação simpática), tem seu programa termogênico ativado, elevando a expressão da Proteína Desacopladora 1 (UCP-1) a níveis semelhantes aos do tecido adiposo marrom (FONSECA RAPOSO, 2022).

Intervenções decorrentes de adversidades no ambiente materno durante a vida perinatal da prole (tanto durante a vida intrauterina quanto em fases mais precoces do neonato, como o período de aleitamento), têm relação direta com o modo como a regulação do metabolismo ocorre na vida adulta. Como bem caracterizado por David J.P. Barker e Charles N. Hales, nos anos 90, o baixo peso ao nascer tem relação direta com o surgimento de disfunções metabólicas tais como obesidade, diabetes tipo 2 e hipertensão arterial na vida adulta do indivíduo (BARKER *et al.*, 1990; BARKER *et al.*, 1989). Diante de seus achados, muitos outros estudos experimentais foram desenvolvidos dando ênfase a sua hipótese e assim evidenciando mecanismos envolvidos em tais modulações metabólicas (ALMEIDA *et al.*, 2019; HEIJMANS *et al.*, 2008).

Neste contexto, deu-se ênfase ao conceito das Origens Desenvolvimentistas da Saúde e da Doença (DOHaD, *Developmental Origins of Health and Disease*), no qual aborda-se a relação entre diferentes insultos neuroendócrinos decorrentes de estresses fisiológicos ocorridos em momentos críticos do desenvolvimento como a concepção, gravidez, lactação e adolescência, onde estes eventos podem programar o metabolismo ao longo da vida de um indivíduo (GLUCKMAN *et al.*, 2005; GLUCKMAN; HANSON, 2004; HEINDEL *et al.*, 2015; MANDY; NYIRENDA, 2018).

1.2. Insultos perinatais como origem para o desenvolvimento da obesidade

A compreensão dos mecanismos que controlam o balanço entre a ingestão e o gasto de energia, bem como a elucidação dos mecanismos que envolvem o acúmulo de lipídios corporais, é de grande relevância na busca de possibilidades terapêuticas para o tratamento da obesidade. Muitas descobertas sobre esse assunto, no âmbito científico, deram-se por meio de pesquisas utilizando modelos experimentais para o desenvolvimento de obesidade, os quais foram imprescindíveis no entendimento que atualmente há sobre essa fisiopatologia (SPEAKMAN *et al.*, 2007).

A indução à obesidade pode ser realizada em animais por modulações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas (VON DIEMEN *et al.*, 2006). Esses estudos têm nos mostrado que o sistema nervoso central regula o gasto energético e a ingestão alimentar, mantendo uma relação entre os glicocorticóides adrenais, o sistema nervoso autônomo e o comportamento alimentar no desenvolvimento da obesidade (VON DIEMEN *et al.*, 2006).

O modelo de modulação neuroendócrina por lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial (VMN) pode ser por administração de glutamato monossódico (MSG) ou lesão elétrica direta (VON DIEMEN *et al.*, 2006). No modelo MSG é feita administração subcutânea ou intraperitoneal de glutamato monossódico em ratos recém-nascidos, causando uma destruição do VMN e do núcleo arqueado, levando-os a desenvolverem obesidade devido à falta de controle entre a absorção e o gasto energético, e hiperleptinemia (NAKAGAWA *et al.*, 2000). Já na obesidade induzida por lesão elétrica direta, os eletrodos são posicionados no hipotálamo e a corrente elétrica pode causar destruição bilateral dos núcleos hipotalâmicos, levando à obesidade onde os animais apresentam hiperfagia, perdendo o controle de sensação de saciedade (SHIMIZU *et al.*, 2003).

Quanto aos modelos animais de obesidade induzida através de dietas hipercalóricas, os quais mais se assemelham à condição que leva ao estado de obesidade comum em humanos do que nos modelos geneticamente modificados, existem diferentes modelos induzidos por distintas dietas (LUTZ; WOODS, 2012). As dietas ricas em carboidratos (hiperglicídicas) e as hiperlipídicas atingem valores hipercalóricos com excessivo ganho energético (SALEH *et al.*, 2014), sendo, portanto, conhecidas como dietas obesogênicas, uma vez que promovem acúmulo de gordura visceral e resistência insulínica (DONNER *et al.*, 2015; SADOWSKA *et al.*, 2017; SALEH *et al.*, 2014).

Outros modelos conhecidos como dietas de “cafeteria” imitam melhor a dieta humana, onde os animais são expostos às dietas obesogênicas ricas em alimentos calóricos que fazem parte dos hábitos dos países ocidentais, compostos por uma quantidade elevada de gorduras e/ou carboidratos, aumentando a massa de tecido adiposo e afetando o perfil lipídico e glicêmico do animal (MARINE-CASADO *et al.*, 2018; ZEENI *et al.*, 2015).

Outro modelo de desenvolvimento de obesidade através de modulação dietética realizado não só com roedores, mas também com ovelhas e porcos, é a restrição proteica ou proteico-calórica durante período gestacional, gerando filhotes pequenos e com alterações morfológicas e funcionais dos sistemas e órgãos (NUNEZ *et al.*, 1996; TRAHAIR *et al.*, 1997).

Existem dois modelos de restrição uterina, em um deles é feito a ligadura da artéria uterina, reduzindo fluxo sanguíneo útero placentário com diminuição do suprimento nutricional para os fetos (POLLAK *et al.*, 1979). O segundo modelo é quando acontece uma restrição alimentar durante a gestação, simulando, em laboratório, a desnutrição de gestantes que ocorre em alguns países em desenvolvimento. Essa restrição alimentar pode ocasionar um ganho de peso insuficiente das ratas durante a gestação, a ninhada também pode ser menor (YOUNG; RASMUSSEN, 1985). Nesse modelo, o baixo peso ao nascer como fator de risco para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas está diretamente ligado aos estudos de Hales e Barker sobre a "hipótese do fenótipo poupador", onde se propõe que uma diminuição da nutrição intrauterina leva a adaptações fisiológicas fetais, que o levam a sobreviver em um ambiente de escassez energética (GLUCKMAN; HANSON, 2004).

Essa é uma adequação que pode ser considerada benéfica, uma vez que o organismo está se preparando para sobreviver em um ambiente hostil. Contudo, com o

passar do tempo, considerando-se que o bebê nascido em um ambiente com escassez nutricional venha a se deparar com um ambiente onde há abundância de alimentos, sejam estes alimentos hipercalóricos ou não, as adaptações fetais no sentido de armazenar reservas energéticas podem se tornar prejudiciais para o metabolismo, levando a um balanço energético positivo e assim a uma condição de obesidade (GLUCKMAN; HANSON, 2004).

Por fim, em se tratando de modelo experimental de indução à obesidade, ao contrário da escassez alimentar, a oferta alimentar excessiva ao neonato também pode repercutir negativamente sobre as vias de regulação do balanço energético, levando o indivíduo a uma programação perinatal para hiperfagia e por conseguinte obesidade (SCHMIDT *et al.*, 2001). Assim, no modelo de redução de ninhada, como será melhor definido no tópico abaixo, é realizada uma redução do número de filhotes na ninhada, promovendo uma superalimentação precoce nos filhotes, decorrente da não competição pelas tetas da mãe durante as mamadas (SCHMIDT *et al.*, 2001).

1.3. Redução de ninhada como modelo para desenvolvimento de obesidade por superalimentação precoce

Dentre os diferentes modelos experimentais para o estudo da obesidade, na superalimentação precoce em ratos há a uma maior oferta de leite aos filhotes pela redução no número de filhotes mamando na mãe, levando-os ao desenvolvimento precoce de hiperfagia e obesidade, modelo este já bem caracterizado e bastante utilizado na literatura científica (PLAGEMANN *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2011).

Neste modelo o neonato por estar habitualmente ingerindo leite de modo mais frequente e/ou em quantidades maiores, nesse período crítico da plasticidade neuroendócrina hipotalâmica, acaba por desenvolver uma redução da ação inibitória de hormônios metabólicos importantes como a insulina e a leptina sobre os mecanismos de regulação da ingestão alimentar (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000; 2001).

Nesta perspectiva, como previamente reportado, ratos oriundos de redução de ninhada são hiperfágicos, apresentam obesidade, resistência à insulina, intolerância à glicose e disfunções endócrino-pancreáticas associadas às alterações no sistema nervoso autônomo (DE ALMEIDA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2017; RINALDI *et al.*, 2014). Contudo, tem-se observado que intervenções precoces na vida destes animais, tais como a realização de atividade física, modula vias neuroendócrinas e a função autonômica

nestes ratos, promovendo atenuação das disfunções metabólicas (RIBEIRO *et al.*, 2017; RINALDI *et al.*, 2014).

A inflamação de baixo grau que ocorre no tecido adiposo neste modelo, geralmente é potencializada quando esses animais são alimentados com dietas hiperlipídicas (LUTZ; WOODS, 2012). Além do processo inflamatório observado em tecidos periféricos, evidências apontam que nesse modelo há também certo grau de inflamação central, as quais podem levar a modificações epigenéticas responsáveis por causar muitas das alterações metabólicas já relatadas anteriormente (SINGER; LUMENG, 2017).

1.4. Regulação central da ingestão alimentar

A regulação fisiológica da ingestão alimentar, ocorre através dos centros da fome (núcleo hipotalâmico lateral) e da saciedade (núcleo hipotalâmico ventromedial), bem como do sistema entérico através da função digestiva, visando manter em equilíbrio o consumo, armazenamento e o gasto energético, a fim de proporcionar a homeostase energética do organismo (SAINSBURY *et al.*, 2002; WILLIAMS *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos, já temos importantes avanços no conhecimento dos mecanismos hipotalâmicos envolvidos nesse controle da homeostase energética. Sabemos que o tecido adiposo tem como função o armazenamento de energia, mas também é produtor e secretor de peptídeos e proteínas bioativas (adipocinas), sendo conhecido como um órgão endócrino (BROWN, 2008).

Diante disso, o tecido adiposo, em proporção aos seus estoques, irá produzir e secretar sinais reguladores que agem no cérebro, mais especificamente no hipotálamo que é o centro regulador do apetite e saciedade (BROWN, 2008; ROBBINS *et al.*, 2016).

Durante a ingestão alimentar os sinais de saciedade são gerados no trato gastrointestinal (TGI), ocorrendo após a entrada de alimento. Esses sinais diminuem a ingestão de alimentos através da inibição de circuitos anabólicos, e aumentam o gasto energético através da ativação de circuitos catabólicos (DRUCE; BLOOM, 2006; FONSECA-ALANIZ *et al.*, 2006; UAUY; DIAZ, 2005; VALASSI *et al.*, 2008).

Os neuropeptídeos anorexígenos responsáveis por inibir o apetite como leptina, pró-opiomelanocortina (POMC) e transcrito regulado por anfetamina e cocaína (CART)

e os orexígenos, que aumentam o apetite, como neuropeptídeo Y (NPY) e proteína relacionada agouti (AgRP) e hormônio concentrador de melanina (MCH), atuam na regulação do controle alimentar e balanço energético. A leptina e a insulina são hormônios secretados conforme a proporção dos adipócitos e atuam, no SNC, ao interagirem com seus respectivos receptores no hipotálamo, estimulando a saciedade (SAINSBURY *et al.*, 2002).

A leptina, produzida principalmente no tecido adiposo branco, atua como um neuromodulador do balanço energético, sendo que sua ação é mediada pelas vias NPY/AgRP aumentadas e inibição dos neurônios POMC. Quando ela está aumentada ocorre uma diminuição da ingestão alimentar e aumento do gasto energético (WOODS *et al.*, 1998).

A insulina por sua vez é produzida pelas células beta pancreáticas, sendo que a sua concentração no sangue é também proporcional à adiposidade. Apresenta efeito anabólico, atua aumentando a captação de glicose (WOODS *et al.*, 1998). Por outro lado, estudos experimentais retratam que a insulina tem uma função fundamental no SNC para promover a saciedade, aumentar o gasto energético e regular a ação da leptina (SCHWARTZ *et al.*, 2000). Ela também interfere na secreção do peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1), atuando na inibição do esvaziamento gástrico, promovendo uma sensação de saciedade prolongada (VERDICH *et al.*, 2001).

1.5. Citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias na obesidade

O tecido adiposo secreta várias substâncias, conhecidas como adipocinas, algumas delas exercem papel pró-inflamatório e outras anti-inflamatório (FUKUHARA *et al.*, 2005). Dentre as adipocinas pró-inflamatórias estão a interleucina 6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α). Por sua vez, dentre as adipocinas anti-inflamatórias estão a interleucina 10 (IL-10) e a adiponectina. Quando o processo de obesidade se instala no organismo, apresenta um aumento das citocinas séricas, com exceção da adiponectina (FUKUHARA *et al.*, 2005).

A IL-6 exerce ação direta sobre a sensibilidade à insulina, alterando a sinalização em hepatócitos, por meio da inibição do receptor de insulina dependente de autofosforilação, promovendo então uma resistência à ação desse hormônio no tecido (VAN HALL *et al.*, 2003).

A IL-6 pode estimular a síntese hepática de triglicerídeos, contribuindo para um quadro de hipertrigliceridemia associada à obesidade visceral. Essa citocina se liga aos seus receptores ativando a cascata de sinalização intracelular, levando à uma resposta inflamatória. Após isso, inibe a atividade da lipoproteína lipase estimulando a lipólise, afetando diretamente o perfil lipídico e pode contribuir para a formação e instalação da doença aterosclerótica (VAN HALL *et al.*, 2003).

O TNF- α é produzido por adipócitos e está aumentado no tecido adiposo de obesos, também está envolvido na resistência à insulina por inibir a fosforilação da tirosina presente no substrato-1 do receptor de insulina (IRS-1) (MONTANI *et al.*, 2002).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir a síntese de adipocinas pró-inflamatórias por linfócitos T e macrófagos. Também inibe a síntese do TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 em monócitos e macrófagos e sua presença tem sido demonstrada em placas ateroscleróticas. Devido à produção de várias substâncias pró-inflamatórias o tecido adiposo trabalha em conjunto com o sistema imunológico, havendo um estado de inflamação crônica de baixo grau na obesidade (PEREZ FERNANDEZ; KASKI, 2002).

1.6. Dieta funcional e/ou alimentos bioativos contra a obesidade

Com o intuito de se combater a obesidade, encontram-se no mercado, uma variedade de produtos de suplementação alimentar para emagrecimento. O valor nutracêutico e as propriedades antioxidantes de alimentos bioativos, têm recebido destaque para a pesquisa nutricional e fitoterápica (EL; KARAKAYA, 2004). Com isso, vêm se dando muita atenção ao uso de produtos naturais como uso medicinal, uma vez que estes produtos apresentam menos efeitos colaterais e muitos benefícios terapêuticos. Compostos à base de extratos vegetais, como a faseolamina, substância encontrada no feijão branco, possui propriedades para controlar o nível de glicose no sangue e prevenir suas complicações em longo prazo.

Nesse sentido, é interessante observar que o consumo de alimentos funcionais vem sendo aplicado como meio de evitar o desenvolvimento de doenças metabólicas (GUARDA *et al.*, 2014; MARTIN *et al.*, 2018).

Existem várias espécies de feijão comum, o qual é classificado botanicamente como uma planta herbácea, trepadeira ou não, pertencente à família *Leguminosae*, subfamília *Faboideae* e ao gênero *Phaseolus L.*, tendo como classificação de espécie

Phaseolus vulgaris L. (DEBOUCK, 1991; UFRGS, 2019). Em escala global, o feijão branco tem pouca importância comercial, devido ao seu consumo ser pequeno e até inexistente em países desenvolvidos, contudo aqui no Brasil ele é bastante aceito na culinária pela população, sendo o Brasil o maior produtor e consumidor de feijão, seguido pela Índia, China e México (DEPEC, 2018).

No feijão branco está presente a substância faseolamina, a qual contém propriedades de inibição da α -amilase, enzima digestiva produzida principalmente nos ácinos pancreáticos que ao ser excretada no trato gastrointestinal atua promovendo a hidrólise de carboidratos em oligossacarídeos (BARRETT; UDANI, 2011; FANTINI *et al.*, 2009; OBIRO *et al.*, 2008). A faseolamina, ao inibir a α -amilase atua reduzindo os níveis glicêmicos (LIENER *et al.*, 1984; LOI *et al.*, 2013; NOLAN *et al.*, 2020), o que a torna uma biomolécula com potencial eficácia no controle de disfunções metabólicas como o diabetes tipo 2 e a obesidade.

Em relação aos estudos com seres humanos, Mazur (2014) em revisão integrativa, com objetivo de verificar as propriedades do feijão branco no emagrecimento, constatou propriedades de aumento de saciedade, diminuição do peso corporal em indivíduos que consumiam a farinha de feijão branco, chegando à conclusão de que esses resultados devem-se ao seu alto teor de fibras, proteínas e propriedades de inibição da enzima α -amilase; no entanto não encontrou estudos que tratam da suplementação em longo prazo no tratamento da obesidade.

Em um estudo randomizado com 25 indivíduos saudáveis com sobrepeso (IMC 25-30), divididos em dois grupos, um placebo e outro experimental, administrou-se 1.000 mg diárias de extrato de feijão branco fracionado (500 mg, 2 vezes ao dia, antes das refeições), em conjunto com um programa de emagrecimento (dieta com nutricionista, exercícios com personal trainer e intervenção comportamental com psicólogo). Onde se concluiu que houve perda de peso e redução da circunferência da cintura de modo mais proeminente no grupo ativo que ingeriu o extrato de feijão branco (UDANI; SINGH, 2007).

Alguns estudos realizados com animais demonstraram que o consumo de extrato seco de *Phaseolus vulgaris* L. diminui o apetite por doces, promovendo sensação de saciedade (LOI *et al.*, 2013; MACCIONI *et al.*, 2010). Zhu e colaboradores (2012) também mostraram, que conforme aumenta-se a concentração de extrato de faseolamina, há melhora nos níveis de colesterol total e triglicérides. Já Thompson e colaboradores (2008), em estudo com obesidade induzida por dieta, observaram que a

alimentação hipercalórica juntamente com a suplementação de feijão vermelho teve uma redução nos níveis de colesterol total e lipoproteína de baixa densidade (LDL-c).

Outros estudos para investigar qual o efeito que a farinha de feijão branco possa exercer em um fenótipo obeso em camundongos mesmo mantendo uma dieta obesogênica e quais os efeitos antiobesogênicos em outro modelo animal com indução à obesidade por dieta com alto teor de gordura. Nos dois trabalhos foram demonstrados melhora no fenótipo obeso (saúde intestinal e inflamação adiposa) e redução no acúmulo de gordura do tecido adiposo respectivamente (MONK *et al.*, 2021; NEIL *et al.*, 2019).

Neste âmbito, nossa hipótese é que a ingestão regular da farinha do feijão branco, como alimento funcional, atenua o desenvolvimento das disfunções metabólicas precocemente programadas no modelo experimental de obesidade induzida por superalimentação precoce.

2 OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar o efeito da dieta suplementada com farinha do feijão branco (*Phaseolus vulgaris L.*) sobre a composição corporal e homeostase glicêmica e lipídica, em ratos metabolicamente programados por obesidade induzida por meio de redução de ninhada durante lactação.

2.2. Específicos

- ✓ Mensurar o peso corporal, ingestão alimentar e hídrica das mães durante a lactação;
- ✓ Quantificar a composição bioquímica e energética do leite materno ao décimo segundo dia de lactação;
- ✓ Avaliar o comportamento alimentar da prole durante a lactação;
- ✓ Analisar a evolução ponderal da prole ao longo de seu desenvolvimento e sua composição corporal quando adulta;
- ✓ Avaliar o comportamento alimentar da prole ao longo de seu desenvolvimento.
- ✓ Avaliar a homeostase glicêmica e perfil lipídico da prole;
- ✓ Quantificar o perfil inflamatório hipotalâmico;
- ✓ Quantificar a responsividade hipotalâmica ao hormônio insulina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais, condições de criação e experimentação

Todos os protocolos experimentais aqui propostos foram desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da UFMT (processo nº 23108.089573/2020-23), de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) segundo a Lei 11.794/2008.

Foram utilizados ratos Wistar, oriundos do biotério central da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus* Universitário de Cuiabá, os quais foram alocados e mantidos durante toda a experimentação no biotério setorial do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS), da UFMT, *Campus* Universitário de Sinop, onde inicialmente ficaram em período de adaptação por 1 semana ao novo ambiente.

Ao longo de todo o período experimental, os ratos foram mantidos em ambiente com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($50\pm 5\%$), períodos alternados de luz e escuridão (12-12h) controlados, com oferta de água e ração *ad libitum* (Nuvilab[®], Curitiba, PR, Brasil).

3.2 Acasalamento e detecção de prenhez

Antes do acasalamento, foi realizado o acompanhamento do peso das matrizes por 1 semana, após isso foram postas 2 fêmeas juntamente com um macho reprodutor, deixando-os por 2 semanas em acasalamento, ou até detectar que a fêmea ficou prenha através do ganho de peso.

Após obtenção da prenhez, as fêmeas foram separadas dos machos e mantidas em caixas individuais durante todo o período de gestação e lactação, onde tiveram seu peso corporal, ingestão alimentar e hídrica aferidos a cada dois dias até o desmame das suas respectivas proles, aos 22 dias de lactação.

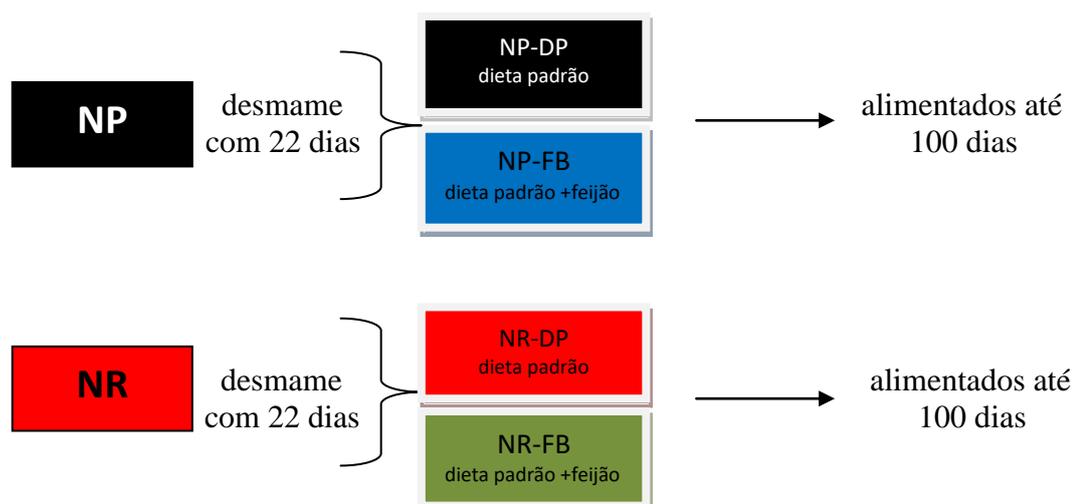
3.3 Modelo experimental de obesidade por superalimentação precoce

No dia do parto, todos os filhotes foram pesados e submetidos à sexagem, sendo considerado dia 0. Ao terceiro dia de vida dos filhotes, as ninhadas foram padronizadas randomicamente para 3 filhotes por mãe lactante (grupo NR, *o número de 3 filhotes por*

mãe lactante é caracterizado como ninhada reduzida, o que leva a hiperfagia e obesidade precoce), modelo já bem caracterizado na literatura (AUBERT *et al.*, 1980; CRYER; JONES, 1980), enquanto que o grupo controle foi ajustado para 8 filhotes por mãe lactante (grupo NP, o número de 8 filhotes por mãe lactante é caracterizado como ninhada padrão, o que mantém melhor aporte nutricional e frequência adequada de mamadas) já reportado por (HABBOUT *et al.*, 2013).

Como no presente estudo não objetivamos avaliar efeitos relacionados ao dimorfismo sexual, as ninhadas do grupo NR foram compostas exclusivamente por machos, enquanto as ninhadas do grupo NP foram formadas preferencialmente por machos, sempre que possível, contudo, quando não havia 8 machos na ninhada, o número de 8 filhotes como padronização da ninhada foi completado com fêmeas, as quais foram eutanasiadas ao desmame (aos 22 dias de lactação).

O desmame foi feito aos 22 dias de vida da prole, após este período cada grupo foi subdividido em outros dois subgrupos: grupos NP-DP (n=24 ratos oriundos de 3 ninhadas diferentes) e NR-DP (n=12 ratos, oriundos de 4 ninhadas diferentes) que continuaram sendo alimentados com dieta padrão para roedores, e os grupos NP-FB (n=28 ratos, de 4 ninhadas diferentes) e NR-FB (n=15 ratos, oriundos de 5 ninhadas diferentes), alimentados com dieta padrão para roedores suplementada com o 2,5% da farinha de feijão branco (*Phaseolus vulgaris L.*) até a vida adulta (100 dias de vida), conforme fluxograma abaixo:



Ao longo de todo o período experimental, a prole foi mantida em ambiente com temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($55\pm 5\%$), períodos alternados de luz e escuridão (12-12h) controlados e oferta de água e ração *ad libitum*.

O peso corporal da prole foi aferido ao nascimento e a cada dois dias durante toda a lactação. Após o desmame, tanto o peso corporal quanto a ingestão alimentar e hídrica da prole foram aferidos a cada dois dias durante todo o período experimental (dos 22 aos 100 dias de vida).

3.4 Ordenha do leite

No 12º dia de aleitamento, as ratas lactantes, foram separadas de seus filhotes por 2 horas, para obter acúmulo de leite nas glândulas mamárias, e após esse tempo sucedeu-se a ordenha (LEITE *et al.*, 2007). Para a ordenha, as mães foram anestesiadas (ketamina-xilazina, 75mg + 15mg/kg, i.m). Após anestesia foi aplicada ocitocina sintética (8UI/mL, na dose de 2,5UI/kg de peso corporal, i.p.) para estimular a ejeção do leite (DEPETERS; HOVEY, 2009; MIRANDA *et al.*, 2017). A ordenha foi feita manualmente conforme protocolo adaptado por (LEITE *et al.*, 2007), utilizando-se uma pipeta graduada para coleta de ~500µL de leite, o qual foi posto em microtubo plástico que durante todo o procedimento ficou alocado sobre placa de gelo (MIRANDA *et al.*, 2017).

As amostras de leite foram coletadas e armazenadas em microtubos estéreis e imediatamente congeladas a -20°C, para dosagem bioquímica (glicose, triglicerídeos e colesterol total) e valor energético através da técnica de crematócrito (XAVIER *et al.*, 2019).

3.5 Crematócrito do leite

Os microtubos contendo as amostras de leite foram descongelados e homogeneizados com o auxílio de Vórtex, e alocados em tubo capilar para hematócrito (LUCAS *et al.*, 1978) (alíquotas de 75µL). Foi feita uma oclusão em uma das extremidades do tubo capilar de modo que esta extremidade ficasse posicionada de fora para dentro, e então micro centrifugados a 995 g durante 15 minutos. Posteriormente, observou-se a formação de um precipitado branco pastoso denominado creme, e parte do soro que compunha o leite. Utilizou-se, portanto, uma escala de leitura de hematócrito específica expressa em milímetros, a fim de mensurar a porcentagem do teor de creme presente na amostra através do número de células estimados.

A obtenção da porcentagem de gordura e posterior valor energético, foi possível através de fórmula pré-estabelecida considerando a medida obtida após a leitura, e

utilizando-se os respectivos controles como dados comparativos. Para tanto, uma equação de regressão foi utilizada:

- 1) Avaliação do teor de creme: $\text{Coluna de creme (mm)} \times 100 \div \text{coluna total (mm)} = \% \text{ de creme}$;
- 2) Avaliação do teor de gordura: $(\% \text{ de creme} - 0,59) \div 1,46 = \% \text{ de gordura}$;
- 3) Cálculo do conteúdo energético total: $(\% \text{ de creme} \times 66,8 + 290) = \text{kcal/L}$;
- 4) Coluna total = coluna de creme + coluna de soro;
- 5) Coluna de creme = componentes lipossolúveis + conteúdo proteico.

3.6 Avaliação da ingestão de leite pela prole

Aos 6º, 11º e 16º dias de vida, os ratos foram separados de suas mães para jejum de 4 horas. Após este período, foram pesados e postos juntos a suas respectivas mães para o aleitamento pelo período de 1 hora. Em seguida foram imediatamente pesados, e então a diferença entre o peso anterior e o peso pós mamada foi considerada como a quantidade de leite ingerida, protocolo modificado de (BAUTISTA *et al.*, 2019).

3.7 Preparo da dieta suplementada com farinha de feijão branco

O *Phaseolus vulgaris L.* foi adquirido por meio de compra em supermercado localizado no município de Sinop, MT. O mesmo foi triturado e posteriormente a farinha foi adicionada à ração padrão para roedores na proporção de 2,5% (PEREIRA, 2008).

Para o preparo da ração suplementada com FB conforme mostra na figura 1, os pellets de ração padrão para roedores foram quebrados com auxílio de um martelo (passo 1), depois trituradas em liquidificador (passo 2) dando origem a um farelo que foi misturado com a farinha de FB, adicionou-se água em quantidade necessária para umedecer a mistura suficientemente para que o processo de peletização fosse possível (passo 3). Após este processo, a ração peletizada foi acondicionada em formas de alumínio como mostra no passo 4 e levada à estufa com circulação forçada de ar e temperatura de 55°C por 24 horas (passo 5). Essa temperatura é requerida a fim de evitar a perda de compostos voláteis e modificações químicas, o que possibilita a análise de seus componentes em períodos subsequentes (DETMANN *et al.*, 2012). Após a secagem, a ração foi acondicionada a -20°C para suprir a demanda de consumo pelos animais.



Figura 1. Etapas de confecção de ração acrescida de farinha de feijão branco a 2,5%. Passo 1: quebra dos pellets de ração padrão. Passo 2: trituração dos pellets para dar origem ao farelo. Passo 3: processo de peletização da ração. Passo 4: ração peletizada acondicionada em formas. Passo 5: Estufa para secagem da ração.

3.8 Análise da composição centesimal das dietas

Para análise da composição centesimal das dietas, foram determinados o teor de umidade, proteínas, lipídeos totais, carboidratos totais, fibra alimentar total e cinzas das amostras, considerando os valores médios, como mostrado na Tabela 1. Inicialmente as amostras foram moídas em Moinho tipo Wiley com peneira de 1mm. Posteriormente o teor de umidade foi caracterizado, adotando-se o método de secagem em estufa a 105°C sem circulação de ar até peso constante, de acordo com métodos oficiais da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), no qual foi realizada toda essa análise Bromatológica em parceria com o laboratório da Zootecnia – UFMT/Sinop.

A proteína foi estimada considerando-se os teores de nitrogênio total empregando-se o fator de conversão geral de 6,25 recomendada por Jones (MARIOTTI *et al.*, 2008). O nitrogênio total da amostra foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl, utilizando-se sulfato de cobre e sódio como catalisadores na mineralização e ácido bórico como solução receptora da amônia na destilação, conforme preconizado pela AOAC e American Association of Cereal Chemists (AACC) (SEIBEL, 1989).

As cinzas foram obtidas por incineração do material em forno de mufla a 550°C e os lipídios totais foram determinados através de extração contínua, pelo método de Randall, utilizando-se éter de petróleo como solvente (AOCS; método Am 5-04).

Em relação aos teores de carboidratos foram estabelecidos por diferença, considerando as porcentagens de água, proteína, lipídeos totais e cinzas. Nos valores de carboidratos estão contidos a fibra alimentar total. Por sua vez a fibra alimentar total, foi determinada pelo método enzimático gravimétrico da AOAC e Prosky *et al.* (1985).

As vitaminas e minerais foram estimados com base na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA - USP, 2020), de acordo com os valores descritos em 100g de feijão branco, cru, *Phaseolus vulgaris L.* (código TBCA: C0027T).

O cálculo do valor energético das dietas foi estabelecido de acordo com o sistema Atwater, utilizando os fatores de conversão específicos, e expressa em quilocalorias (kcal) (JONES, 1931; MERRIL; WATT, 1973).

Tabela 1. Valores médios (g/kg) da composição bromatológica da ração padrão para roedores (Nuvilab[®]) e ração padrão para roedores (Nuvilab[®]) acrescida de 2,5% *Phaseolus vulgaris* L. (FB)

Componente	Dietas	
	Ração padrão Nuvilab [®]	Nuvilab [®] + FB
Umidade (g/kg)	46,80	52,50
Cinzas (g/kg)	72,83	78,50
Proteína bruta (g/kg)	225,62	251,40
Extrato etéreo (g/kg)	51,95	44,82
Fibra alimentar (g/kg)	144,31	152,80
Carboidrato (g/kg)	458,49	472,50
Valor energético (kcal/kg) ¹	3.203,99	3.903,6

¹ Energia alimentar expressa em quilocalorias por quilograma de peso.

3.9 Teste de preferência alimentar

Aos 80 dias de vida da prole, ofertou-se aos ratos de ambos os grupos experimentais, de maneira concomitante, dois tipos de dieta (ração comercial padrão para roedores e ração comercial padrão para roedores suplementada com FB, respectivamente) a fim de avaliar a preferência alimentar entre ambas.

As dietas foram dispostas na grade, alocadas lado a lado e em quantidades similares (200g). A avaliação ocorreu por um período de 24 horas, após foi realizada aferição do consumo. Esse procedimento foi realizado considerando-se a ingestão coletiva de todos os animais na caixa.

3.10 Implante de cânulas-guia por cirurgia estereotáxica

Entre 90 e 95 dias de vida os ratos foram submetidos ao procedimento cirúrgico para implante de uma cânula no ventrículo lateral direito. Foi administrada uma solução anestésica em cada animal composta de 0,2mL de Cetamina a 10% (Agener; 92mg/kg) e 0,1mL de Xilasina a 4% (Dopaser; 9,2mg/kg) (i.m). Após anestesia, o animal foi posicionado em aparelho estereotáxico (Insight[®], Ribeirão Preto, Brasil) fixando inicialmente a cabeça, por meio do rochedo temporal e incisivos superiores. Em

seguida, tricotomizou-se a região destinada à incisão cirúrgica e, após, submeteu-se à assepsia com álcool 70% e posteriormente, injeção subcutânea de cloridrato de lidocaína 2% associado a epinefrina objetivando uma vasoconstrição local.

Uma cânula-guia foi confeccionada utilizando agulhas de injeção hipodérmica (diâmetro externo de 0,6mm; diâmetro interno de 0,4mm). A cânula-guia foi ajustada para o comprimento de 11mm, por meio de eletrocorrosão e considerando o Bregma como referência, foi implantada e dirigida ao ventrículo lateral direito, segundo as coordenadas: anteroposterior, -0,80mm; médio-lateral, -1,5mm e dorsoventral, -2,6mm, de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (2007).

Depois de implantada, a cânula-guia foi fixada na calvária por uma prótese de acrílico autopolimerizável (resina odontológica) ancorada por um parafuso de fornitureira de aço inoxidável, a partir de uma incisão mediana. Para evitar a obstrução da cânula-guia por retorno de líquido cefalorraquidiano, introduziu-se um oclisor de aço inoxidável de modo que a região medial foi curvada e uma das extremidades fixada com resina odontológica na prótese de acrílico. E esse oclisor na região da cânula apresentava comprimento de 12 mm.

Após a cirurgia os ratos foram alocados em gaiolas individuais e mantidos aquecidos com manta térmica até passar completamente o efeito da anestesia, de modo a evitar hipotermia. Em seguida, foram mantidos na sala de experimentos por um período de recuperação de 4 dias, com dieta específica de acordo com o tratamento adotado e água *ad libitum* (CAMARGO *et al.*, 2013).

3.11 Avaliação intracerebroventricular (icv) da ação da insulina na prole adulta

No 5º dia de pós-operatório, após jejum de 6 horas (13:00 às 19:00h) os ratos foram submetidos à injeção icv de insulina (10^{-3} mmol/L) ou solução salina (NaCl à 0,9%). Após a retirada do oclisor alocado na cânula, foi administrada 2,5µL de insulina (10^{-3} mmol/L) no ventrículo lateral direito, por uma seringa Hamilton de 5µL (Modelo 701, EUA), preenchida com água deionizada e conectada a uma agulha dental de 0,3mm de diâmetro externo (Mizzy, EUA), por meio de um tubo de polietileno PE-10, após corte. O tubo de polietileno foi preenchido com a insulina, e entre a água deionizada e a insulina formou-se uma pequena bolha, e, a partir do movimento descendente desta, considerou-se como indicativo da eficiência da microinjeção. A extremidade da agulha atingiu o tecido encefálico 1mm abaixo do limite inferior da cânula-guia.

Após a injeção icv, deu-se sequência com a ingestão individual no ciclo de escuro dos animais (conforme será descrito a seguir), para determinar o consumo alimentar após a injeção icv de insulina (AOKI; JIANG; VOGT, 2004).

3.12 Comportamento alimentar

A ingestão alimentar, assim como também a ingestão hídrica dos animais foi aferida a cada dois dias, desde o desmame até a vida adulta (100 dias de vida da prole). Esse procedimento foi realizado considerando-se a ingestão coletiva de todos os animais na caixa.

Para tanto, o valor obtido a partir da diferença entre o valor restante na caixa (ração) ou bebedouro (água), observado após dois dias, e o valor inicial colocado na caixa (ração) ou bebedouro (água) foi dividido pelo número de dias (2) e posteriormente pelo número de ratos na caixa, para inferir-se a ingestão diária de cada rato. Os valores da ingestão alimentar e hídrica foram relativizados pelo peso do animal, sendo assim apresentados como g/100g de peso corporal ou mL/100g de peso corporal.

Quanto a ingestão no ciclo de escuro, a fim de comparar a ingestão alimentar antes e depois do procedimento cirúrgico para implante da cânula icv, aos 90 dias de vida, após jejum alimentar de 6 horas (das 13:00 às 19:00h), os ratos, alocados em caixas individuais, foram pesados e receberam água e ração *ad libitum* no início do ciclo de escuro (às 19 horas). Em seguida, aferiu-se o consumo alimentar, sem efeito de qualquer substância, nas primeiras 4 horas de ciclo escuro (às 23:00), período de maior atividade dos animais, e ao longo do ciclo de escuro, após 12 horas da oferta de alimento (às 07:00). Em todas as aferições, a ingestão alimentar foi relativizada por 100g de peso do animal (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

3.13 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica

Aos 95 dias de vida, em um grupo de ratos foi realizado o teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT), após jejum de 12 horas (02:00 às 14:00) os animais receberam uma dose de glicose (2g/kg peso corporal) injetada na região intraperitoneal. Antes de injetar a carga de glicose foi verificado a glicemia basal sendo considerado (0 min) e após os 30 min, 60 min, 90 min e 120 minutos. Após 24 horas da realização do

ipGTT, realizou-se o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT), após jejum de 4 horas (10:00 às 14:00) os animais receberam uma dose de insulina (1UI/kg peso corporal) na região intraperitoneal. Da mesma forma que foi explicado anteriormente, foi retirada uma amostra de sangue basal (0 min) antes da aplicação da injeção de insulina para aferição da glicemia basal, e, após os 15 min, 30 min, 45 min e 60 minutos como previamente descrito por (MATHIAS *et al.*, 2020).

Todas as amostras de sangue foram obtidas da veia caudal a partir de uma pequena incisão na região da ponta, e a concentração de glicose foi determinada com auxílio de tiras reagentes (glicofitas) utilizando um aparelho portátil denominado glicosímetro (Accu-Chek[®] Active, Roche).

3.14 Parâmetros biométricos e composição corporal da prole adulta

Aos 100 dias de vida, os animais foram eutanasiados para a coleta tecidual e sanguínea. Para evitar contaminação tecidual e alterações nos parâmetros bioquímicos, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina específica para roedores (PIEROZAN *et al.*, 2017), sem efeito prévio de anestésicos (DE OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Imediatamente após a eutanásia, procedeu-se a coleta do sangue em microtubos heparinizados. Posteriormente, aferiu-se o comprimento naso-anal (cm) e deu-se a coleta tecidual, onde foram dissecados os principais depósitos de tecido adiposo branco viscerais (gordura periepididimal, mesentérica e retroperitoneal), amostra representativa da massa magra (músculo esquelético sóleo e extensor longo dos dedos, EDL – membro direito do animal), bem como o tecido adiposo marrom e o hipotálamo.

Assim, a composição biométrica corporal dos ratos foi aferida a partir do índice de adiposidade que foi considerado a partir da soma destes depósitos, normalizada pelo peso corporal do rato: índice de adiposidade = [(gorduras periepididimal + retroperitoneal + mesentérica)/peso corporal x 100].

Quanto ao índice de massa magra, este foi aferido a partir da soma de seus valores, normalizando-o pelo peso do animal: índice de massa magra = [(músculos esqueléticos: sóleo + EDL)/peso corporal x 100].

3.15 Parâmetros bioquímicos

Após eutanásia, o sangue foi imediatamente coletado em microtubos estéreis previamente heparinizados e mantidos em caixa térmica com gelo. Em seguida foi centrifugado durante 10 minutos, sob refrigeração a $1.248 \times g$ (Centrifuga SOLAB[®] refrigerada SL 703). O plasma foi coletado e armazenado a -20°C para dosagens bioquímicas posteriores de glicose, triglicérides, colesterol-total, e lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL) utilizando kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica[®], Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) através de aparelho espectrofotômetro (BEL Photonics).

A obtenção dos resultados referentes as lipoproteínas de baixa densidade (colesterol-LDL) e lipoproteína de muito baixa densidade (colesterol-VLDL) se deu por meio da equação de Friedewald (FRIEDEWALD *et al.*, 1972; MARTIN *et al.*, 2018).

Os valores referentes ao índice TyG foram calculados a partir dos valores de jejum da glicemia e trigliceridemia [$\text{TyG} = \text{Ln}[(\text{Glicemia de jejum}_{(\text{mg/dL})} \times (\text{Triglicérides de jejum}_{(\text{mg/dL})})/2]$], esse valor foi usado como preditor de resistência à insulina (SIMENTAL-MENDIA *et al.*, 2008).

3.16 Dosagem hipotalâmica de marcadores inflamatórios

Para quantificar-se o teor de citocinas hipotalâmicas, a partir do sobrenadante do homogenato do hipotálamo dos animais, foram dosadas as citocinas interleucina 1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-10 e o TNF- α . Para tanto, adicionou-se às amostras 300 μL de tampão fosfato-salino (PBS 1X, NaCl, 136,0 mmol/L; KCl, 2,0 mmol/L; Na₂HPO₄, 10,0 mmol/L; K₂HPO₄, 1,7 mmol/L), as quais em seguida foram homogeneizadas (duas vezes, pulsos de 10 segundos usando um dispersor Ultra-turrax[®] (IKA[®] T10 basic, Alemanha). Posteriormente, o homogenato foi centrifugado a $3.669 g$ e o sobrenadante coletado.

Para a determinação das citocinas, considerou-se as instruções fornecidas pelo fabricante em cada kit, IL-1 β , IL-6 e IL-10 (R&D System) e TNF- α (Biolegend EUA), a qua foi detectada pela técnica de ELISA sanduíche, empregando-se anticorpos monoclonais nas concentrações recomendadas pelo fabricante (R&D SYSTEM e BIOLEGEND).

Placas de microtitulação de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpo de captura diluído em PBS e mantidas a temperatura ambiente por 24 horas. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS 1X - Tween 20 a 0,05%. Foi adicionado às

placas, PBS (20 mL) contendo 1% de albumina do soro bovino (BSA, 0,2 g), para promover o bloqueio de sítios livres do plástico, e mantidas por 1 hora a temperatura ambiente. Já em relação as citocinas recombinantes, utilizadas para realizar a curva padrão, foram diluídas em PBS contendo 1% de BSA e incubadas nas placas por 2 horas em temperatura ambiente. O sobrenadante dos homogenatos também foram incubados, após a pipetagem nos poços, pelo mesmo período. Em seguida, realizou-se a lavagem dos poços com PBS - Tween 20 a 0,05%, por três vezes. Foram adicionados os anticorpos de detecção conjugados a biotina, diluídos em PBS e 1% de BSA e incubados por 2 horas a temperatura ambiente. Novamente os poços foram lavados em três repetições. As placas foram novamente incubadas, agora, com conjugado estreptoavidina-peroxidase por 20 minutos em temperatura ambiente e livre de luz seguida da lavagem por 3 vezes.

Para a revelação foi adicionado uma solução substrato na proporção 1:1 (H_2O_2 e Tetrametilbenzidina) por 20 minutos a temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 100 μ L solução stop (2N H_2SO_4) e a leitura das densidades ópticas feita em um espectrofotômetro automático leitor de microplacas, em comprimento de onda de 450nm com correção pelo comprimento de onda 540nm. As concentrações foram calculadas com base na equação da reta de regressão linear, da curva padrão obtida com citocinas recombinantes de rato, como especificado pelo fabricante.

3.17 Análise estatística

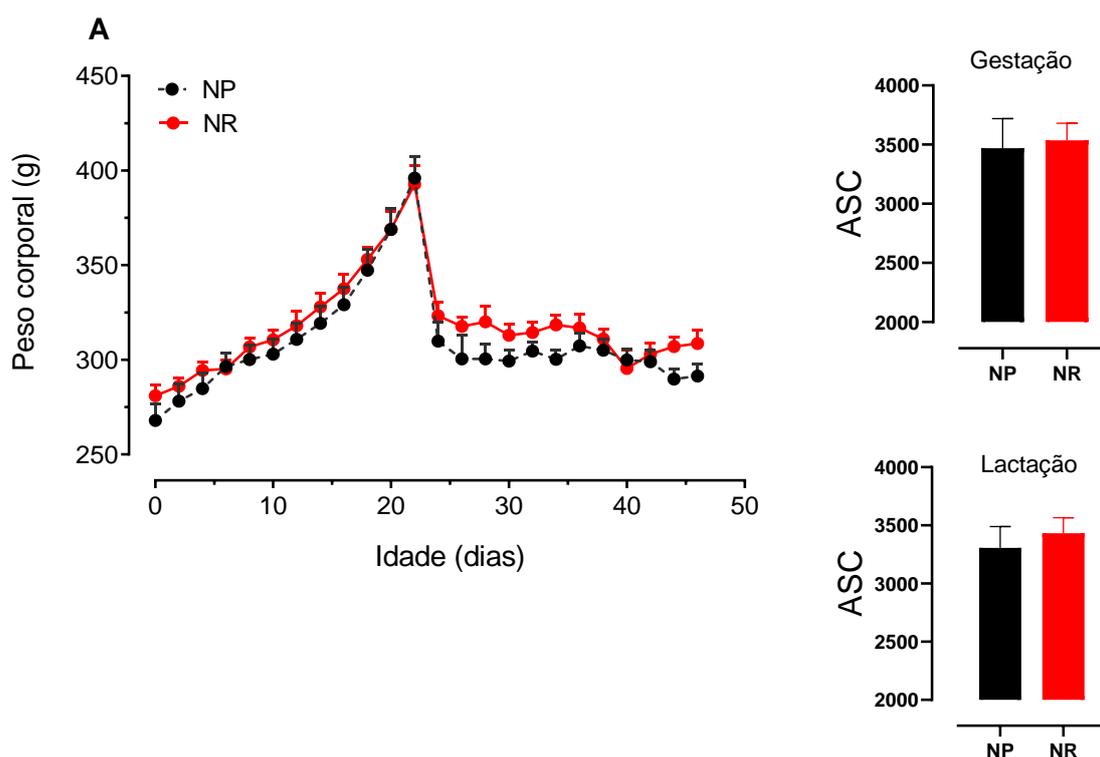
Quanto a comparação entre os grupos experimentais, os dados estão sendo apresentados como média \pm o erro padrão da média, os quais foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade D'agostino & Pearson para avaliação da distribuição Gaussiana, em assumindo uma distribuição normal Gaussiana, os dados foram submetidos a análise estatística (teste t de Student não pareado ou análise de variância de uma via, *one-way* ANOVA quando comparados as médias em mais de dois grupos), seguido por comparações pelo pós teste de Bonferroni.

As análises estatísticas foram realizadas através do programa estatístico GraphPad Prism, versão 8 para Windows (GraphPad Prism[®] Software, San Diego, CA, USA). O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 95%.

4 RESULTADOS

4.1. Peso corporal, ingestão alimentar e consumo hídrico de ratas gestantes e lactantes

Em relação às mães do grupo NP, não foi observada diferença estatística no ganho de peso corporal das ratas NR durante a gestação e lactação ($P > 0,05$, Figura 2A). Quanto à ingestão alimentar, esta não apresentou diferença entre os grupos durante o período de gestação ($P > 0,05$, Figura 2B), como esperado; contudo foi reduzida em 34,90% nas matrizes NR, em relação ao grupo NP durante a lactação ($P < 0,001$, Figura 2B). Da mesma forma, quanto ao consumo hídrico, não apresentou diferença entre os grupos durante o período de gestação ($P > 0,05$, Figura 2C); por outro lado observou-se redução de 26,31% na ingestão das mães NR ($P < 0,01$, Figura 2C) durante o período de lactação.



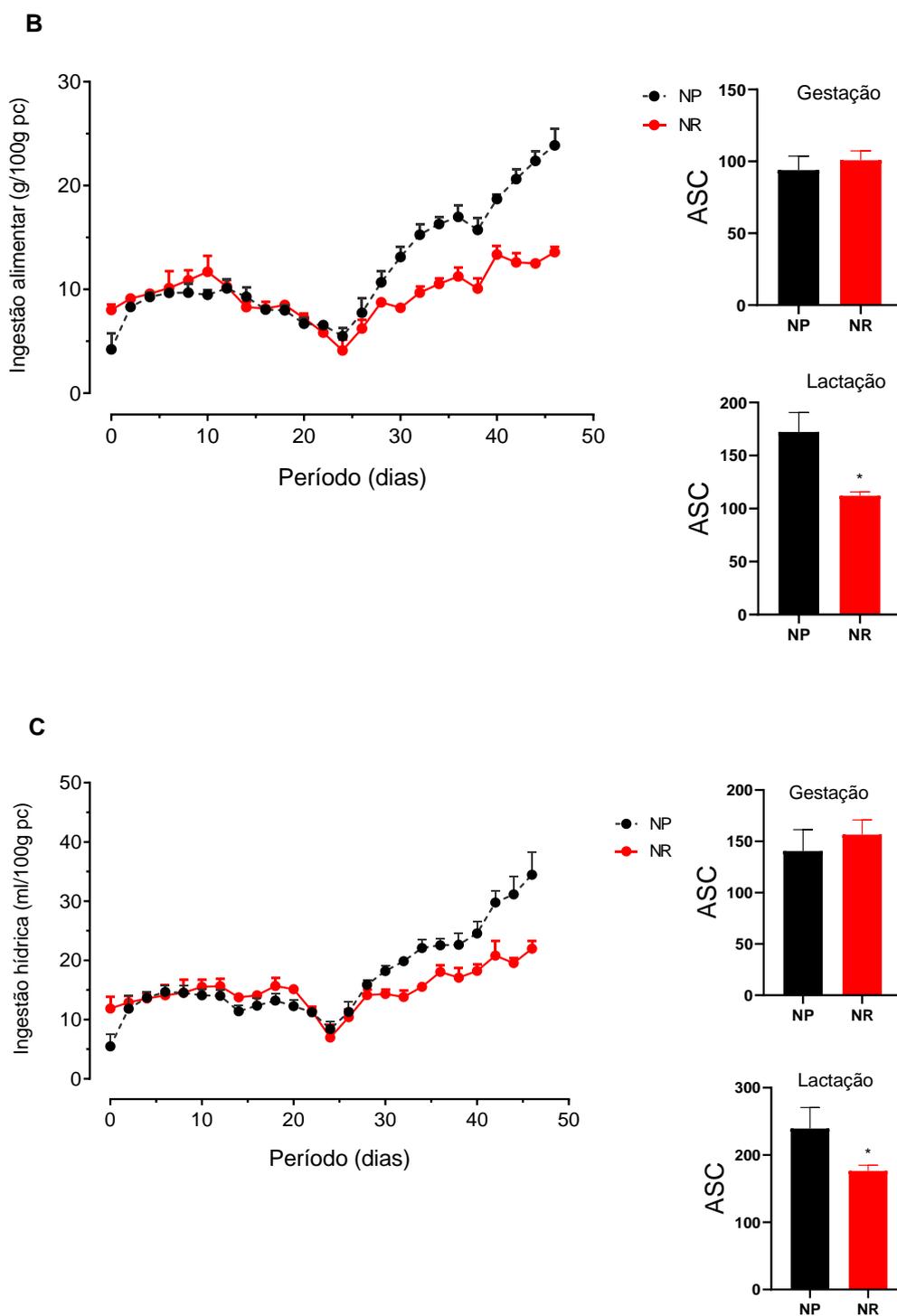


Figura 2. Evolução ponderal (A), ingestão alimentar (B) e hídrica (C) de mães durante gestação e lactação. Os dados representam a média \pm EPM de 12 ratas, os quais foram analisados através do teste t de Student, *representa a diferença estatística entre NR x NP. Os inserts ao lado representam a área sob curva (ASC) durante cada período (gestação e lactação). NP, ninhada padrão; NR, ninhada reduzida.

4.2. Parâmetros bioquímicos e composição do leite materno

Como pode ser visto na Tabela 2, observou-se aumento de 41,02% nos níveis de glicose, 14,24% nos níveis de triglicerídeos e 16,66% nos níveis de colesterol total do leite das ratas NR ($P < 0,05$). Quanto ao valor energético, observou-se aumento no teor de gordura (48,88%, $P < 0,05$), bem como no conteúdo energético total (42,87%, $P < 0,05$) do leite das ratas NR em comparação às matrizes NP.

Por outro lado, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos valores de proteínas totais ($P > 0,05$, Tabela 2).

Tabela 2. Composição bioquímica e energética do leite materno ao 12º dia de lactação.

Parâmetros analisados	NP	NR
Glicose (mg/dL)	304,70 ± 13,09	429,70 ± 49,59*
Proteínas totais (g/dL)	863,70 ± 46,00	1.019,00 ± 88,10
Colesterol total (mg/dL)	254,60 ± 9,70	305,50 ± 10,92*
Triglicerídeos (mg/dL)	1.271,00 ± 61,19	1.452,00 ± 45,73*
Teor de gordura (%)	5,30 ± 0,68	7,80 ± 0,66*
Conteúdo energético total (Kcal/L)	764,30 ± 60,12	1.092,00 ± 117,30*

Os dados representam a média ± EPM de amostras oriundas de 3 a 8 ratas, os quais foram analisados através do teste t de Student, * $P < 0,05$. NP, ninhada padrão; NR, ninhada reduzida

4.3. Evolução ponderal e comportamento alimentar durante lactação

Como esperado, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, quanto ao peso corporal ao nascer (NP: 6,26 ± 0,05 *versus* NR: 6,12 ± 0,06, $P = 0,126$). Durante a lactação, os ratos NR apresentaram um aumento de 16,64% no ganho de peso corporal, em comparação aos ratos NP ($P < 0,001$, Figura 3A).

Quando comparados aos ratos NP, os ratos NR apresentaram maior ingestão de leite ao 6º (+18,89%, $P < 0,01$) e ao 11º dias de vida (+13,16%, $P < 0,05$). Por outro lado, ao 16º dia de vida, a ingestão de leite dos ratos NR foi reduzida, no entanto sem diferença estatisticamente em 9,54%, em relação à ingestão de leite observada nos ratos NP ($P > 0,05$, Figura 3B).

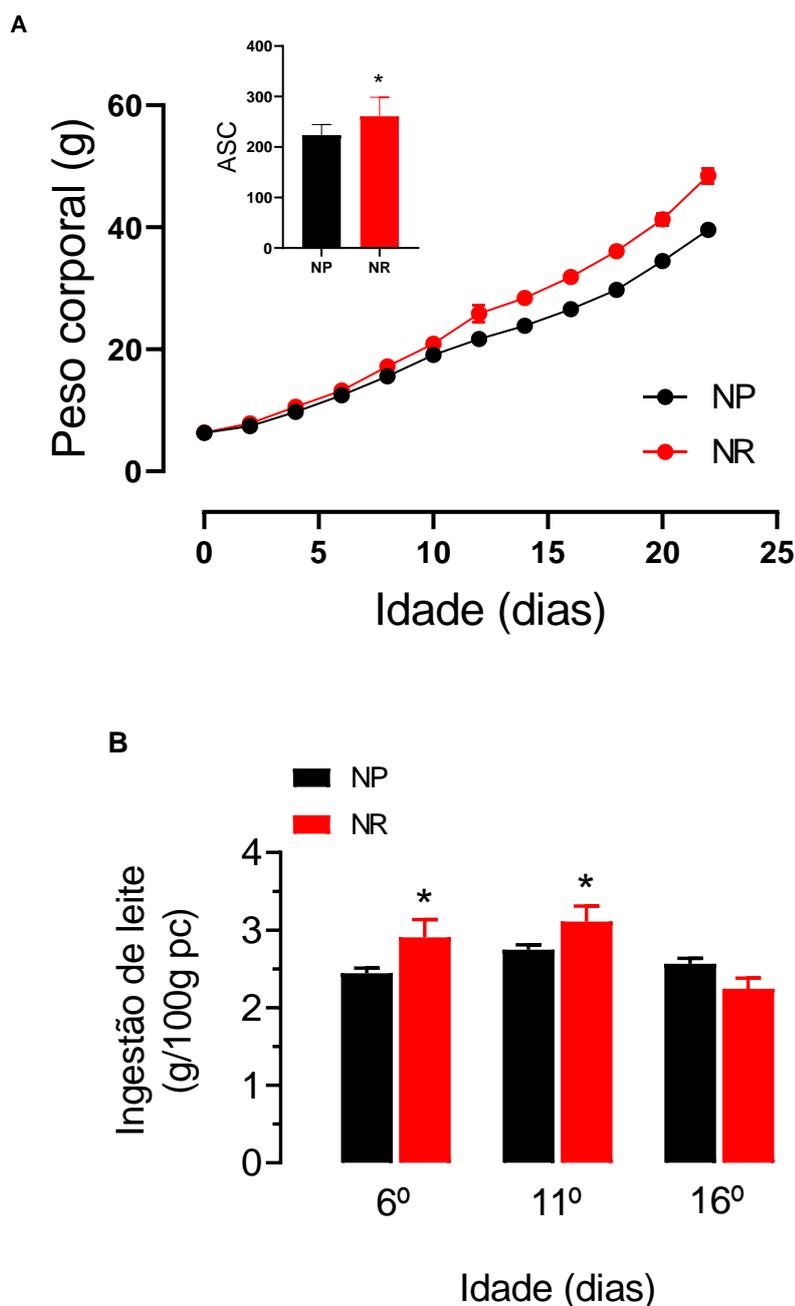


Figura 3. Evolução ponderal (A) e comportamento alimentar (B) durante a lactação. Os dados representam a média \pm EPM de 52-27 animais, oriundos de 6 a 9 ninhadas diferentes, os quais foram analisados através do teste t de Student. *Representa diferença estatística entre NR x NP. O inserto superior na figura A representa a área sob a curva (ASC) durante o período de lactação. NP, ninhada padrão; NR, ninhada reduzida

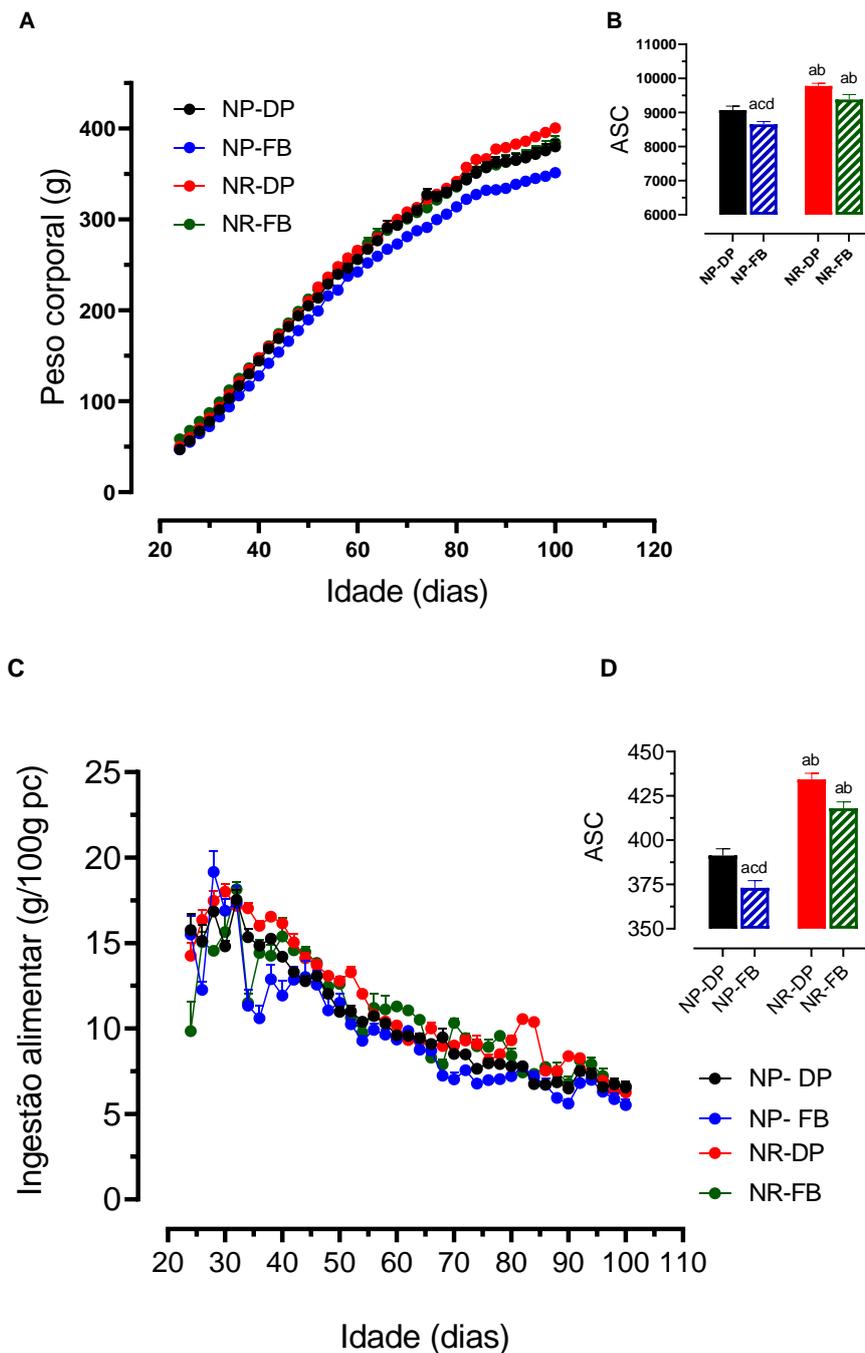
4.4. Evolução ponderal, ingestão alimentar e hídrica da prole após o desmame

Como mostrado na figura 4A–B, ao longo do período pós desmame, os ratos NR-DP mostraram-se 7,78% mais pesados do que os ratos NP-DP ($P < 0,05$). Por outro lado, a suplementação da dieta com feijão branco foi capaz de reverter o ganho de peso corporal dos ratos oriundos de ninhada reduzida. Quando comparados aos ratos NR-DP,

os ratos do grupo NR-FB apresentaram uma redução de 5,91% no ganho de peso ($P < 0,01$, Figura 4A-B). Em relação aos ratos NP-DP, o ganho de peso dos ratos NP-FB reduziu em 4,59% ($P < 0,01$).

Quanto à ingestão alimentar durante o período pós-lactação (Figura 4C-D), observamos maior ingestão alimentar dos ratos NR-DP em relação aos ratos NP-DP (+10,99%, $P < 0,001$). Por outro lado, enquanto observamos uma redução da ingestão alimentar dos ratos NP-FB em 4,65% ($P < 0,05$), não foi observada diferença estatística entre os grupo NR-DP *versus* NR-FB ($P > 0,05$).

Com relação a ingestão hídrica, neste mesmo período, não se observou diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$, Figuras 4E-F).



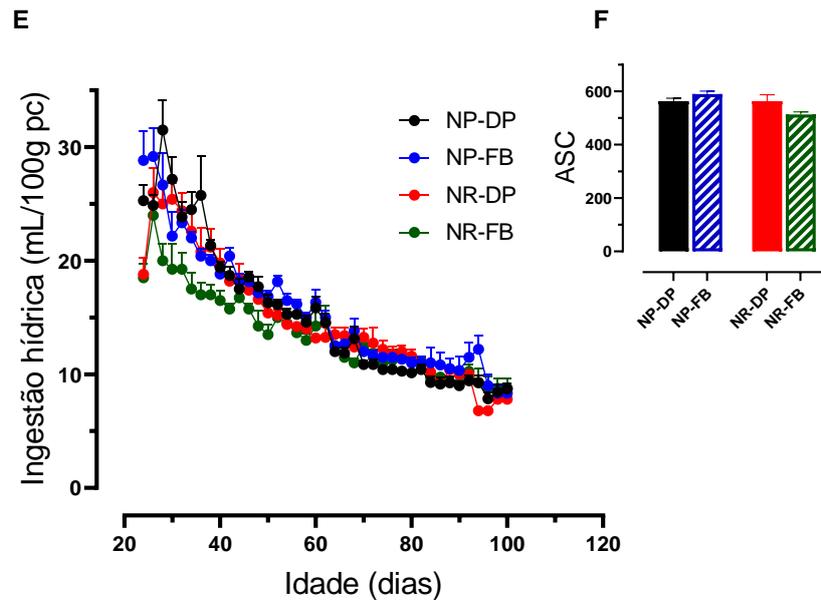


Figura 4. Evolução ponderal (A), ingestão alimentar (C) e hídrica (E) da prole após o desmame. Os dados representam a média \pm EPM de 24 a 28 ratos, oriundos de 4 ninhadas diferentes nos grupos NP, e de 12 a 15 ratos, oriundos de 5 ninhadas diferentes nos grupos NR. As figuras B, D e F, representam a área sob a curva (ASC) das figuras A, C e E, respectivamente, analisadas estatisticamente através de análise de variância (one-way ANOVA) seguido de pós-teste de Bonferroni. As letras sobre as barras significam diferença estatística, através do one-way ANOVA, entre os diferentes grupos experimentais, onde a) grupo NP-DP, ninhada padrão alimentada com dieta padrão; b) NP-FB, ninhada padrão alimentada com dieta suplementada com feijão branco; c) NR-DP, ninhada reduzida alimentada com dieta padrão; d) NR-FB, ninhada reduzida alimentada com dieta suplementada com feijão branco.

4.5. Preferência alimentar

A figura 5 representa a ingestão alimentar dos ratos, durante o teste de preferência alimentar. Em relação aos grupos que já vinham se alimentando com dieta padrão, grupos NP-DP e NR-DP, observou-se preferência pela mesma dieta que já vinham ingerindo ao longo do período experimental (160% e 258,13% $P < 0,001$, respectivamente).

Quanto, aos grupos que já vinham se alimentando com dieta acrescida de feijão branco, NP-FB e NR-FB, observou-se também que estes optaram pela ração padrão para roedores (186,97% e 766,20% $P < 0,001$, respectivamente).

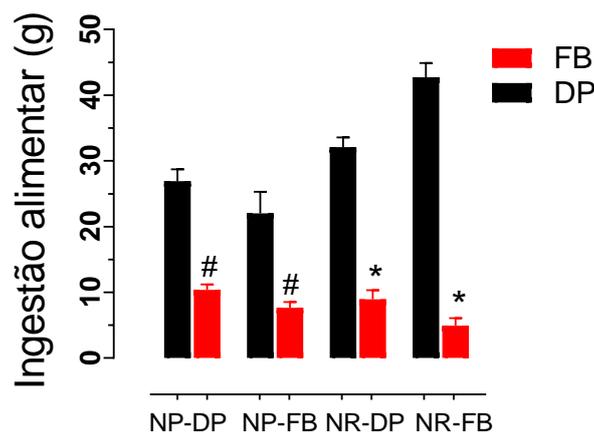


Figura 5. Ingestão alimentar durante o teste de preferência alimentar (dieta padrão versus dieta padrão acrescida com farinha de feijão branco). Os dados representam a média \pm EPM de 24 a 28 ratos, oriundos de 4 ninhadas diferentes no grupo NP e de 12 a 15 ratos, oriundos de 5 ninhadas diferentes no grupo NR. Os dados foram analisados através do teste t de Student. *Representa diferença estatística entre os grupos NR-FB X NR-DP #Representa diferença estatística entre os grupos NP-FB X NP-DP. Grupos experimentais: NP-DP, ninhada padrão alimentada com dieta padrão; NP-FB, ninhada padrão alimentada com dieta suplementada com feijão branco; NR-DP, ninhada reduzida alimentada com dieta padrão; NR-FB, ninhada reduzida alimentada com dieta suplementada com feijão branco.

4.6. Responsividade central à insulina, efeito sobre a ingestão alimentar

A figura 6 mostra a ingestão alimentar aferida nas 4 primeiras horas de ciclo escuro e ao longo de todo o ciclo, durante as 12 horas de escuro, com e sem o efeito da insulina. Em relação aos ratos NP-DP, observou-se hiperfagia nos ratos NR-DP durante as 4 primeiras horas de observação (17,29% $P < 0,05$). Por outro lado, os ratos NR-FB apresentaram uma redução de 18,60% na ingestão alimentar quando comparados aos ratos NR-DP ($P < 0,01$), enquanto que não houve diferença estatística entre o consumo alimentar do grupo NP-FB *versus* NP-DP ($P > 0,05$).

Ainda durante as quatro primeiras horas de avaliação, observou-se que a injeção icv de insulina foi capaz de induzir hipofagia nos ratos NP-DP 30,18% ($P < 0,001$), da mesma forma efeito parecido, embora um pouco mais elevado, foi observado no grupo NP-FB (47,73% $P < 0,001$), bem como em 31,89% no grupo NR-FB ($P < 0,01$), no entanto sem diferença estatística em relação ao NR-DP ($P > 0,05$).

Em relação às observações ao longo de 12 horas, em ciclo escuro, observou-se que a hiperfagia dos ratos NR-DP em relação aos ratos NP-DP foi de 21,33% ($P < 0,05$). Por outro lado não houve diferença estatística entre os grupos NR-FB *versus* NR-DP e NP-FB *versus* NP-DP ($P < 0,05$).

Relativamente à avaliação do consumo alimentar durante a noite, não houve diferença estatística entre os grupos sob a injeção central de insulina ($P < 0,05$).

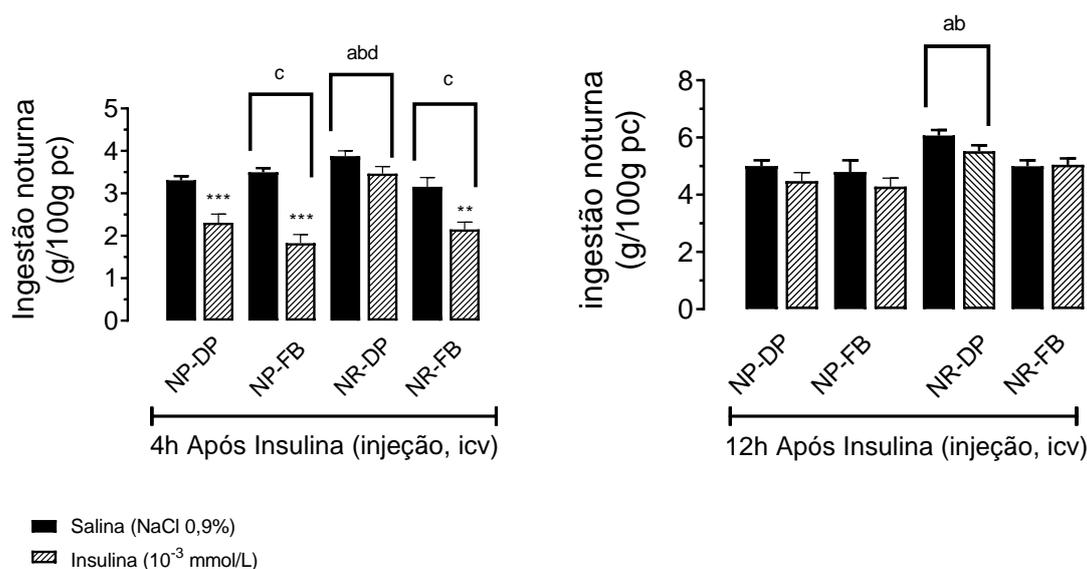


Figura 6. Ingestão alimentar em resposta a ação intracerebroventricular da insulina. Os dados representam a média \pm EPM de 14 ratos, oriundos de 2 ninhadas diferentes no grupo NP e de 6 a 9 ratos, oriundos de 1 a 3 ninhadas diferentes no grupo NR. Os dados foram analisados estatisticamente por meio de one-way ANOVA (comparação intergrupo com e sem ação de insulina), seguido de pós-teste de Bonferroni para período de avaliação de 4 horas e pelo teste de Kruskal-Wallis para a avaliação de 12 horas após a injeção de icv. Os símbolos acima das barras ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ indicam diferenças significativas entre o efeito salina e insulina intragrupo através do teste t de Student. As letras sobre as barras mostram diferenças significativas entre os grupos experimentais, onde a) grupo NP-DP, ninhada padrão alimentada com dieta padrão; b) NP-FB, ninhada padrão alimentada com dieta suplementada com feijão branco; c) NR-DP, ninhada reduzida alimentada com dieta padrão; d) NR-FB, ninhada reduzida alimentada com dieta suplementada com feijão branco.

4.7. Parâmetros bioquímicos e homeostase glicêmica

Como pode ser visto na figura 7A, quando comparados aos ratos NP-DP, os ratos NR-DP se mostram hiperglicêmicos (+17,92%, $P < 0,001$). Por outro lado, em relação aos ratos NR-DP, os ratos NR-FB apresentaram uma redução de 14,51% na glicemia de jejum ($P < 0,01$), mostrando-se normoglicêmicos. Por sua vez, não se observou diferença estatística entre os grupos NP-FB e NP-DP ($P > 0,05$, Figura 7A).

Os ratos NR-DP apresentaram trigliceridemia (+48,40%, $P < 0,05$) e não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos NP-FB e NP-DP (13,91% $P > 0,05$, Figura 7B).

O índice TyG dos ratos NR-DP mostrou-se 9,34% maior quando comparado aos valores dos ratos NP-DP ($P < 0,001$). Já quanto aos ratos do grupo NR-FB houve diminuição dos valores do TyG em 5,19%, no entanto sem diferença estatística em relação aos ratos NR-DP ($P > 0,05$). Por outro lado, não se observou diferença estatística entre os grupos NP-FB e NP-DP ($P > 0,05$, Figura 7C).

Relativamente aos valores de colesterol total dos animais do grupo NR-DP, houve um aumento de 25,52% ($P < 0,01$) com relação aos ratos NP-DP. Quando comparamos o grupo tratado NR-FB com o grupo controle NR-DP houve uma redução de 24,23% ($P < 0,001$) em referência a esse parâmetro. Não foram observadas diferenças estatísticas no grupo NP-FB *versus* NP-DP ($P > 0,05$, Figura 7D).

Não foram observadas diferenças estatísticas nos grupos no tocante aos valores de colesterol HDL dos animais ($P > 0,05$, Figura 7E).

No que se refere aos valores de colesterol VLDL dos animais, o grupo NR-DP aumentou em 62,53% ($P < 0,01$) em relação aos valores do grupo NP-DP. Quando comparamos o grupo tratado NR-FB com o grupo controle NR-DP houve uma redução de 16,24%, entando não foi estatisticamente significativo ($P > 0,05$). Não foram observadas diferenças estatísticas no grupo NP-FB *versus* NP-DP ($P > 0,05$, Figura 7F) nesse parâmetro.

Quando submetidos ao teste de tolerância à glicose (Figura 8A), os ratos NR-DP apresentaram um aumento de 26,12% na ASC dos valores glicêmicos em relação ao grupo NP-DP ($P < 0,05$, Figura 8A). Por sua vez, os ratos NR-FB apresentaram uma redução de 26,63% na ASC dos valores glicêmicos quando em comparação aos ratos NR-DP ($P < 0,01$). Quando comparamos o grupo NP-FB *versus* NP-DP não houve diferença estatística ($P > 0,05$).

Já em relação ao teste de tolerância à insulina, os ratos NR-DP apresentaram uma diminuição de 56,56% no Kitt em relação ao grupo NP-DP ($P < 0,001$, Figura 8B). No entanto, os ratos NR-FB apresentaram um aumento de 135,15% no Kitt quando em comparação aos ratos NR-DP ($P < 0,001$, Figura 8B). Quanto a este parâmetro, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos NP-FB *versus* NP-DP ($P > 0,05$, Figura 8B).

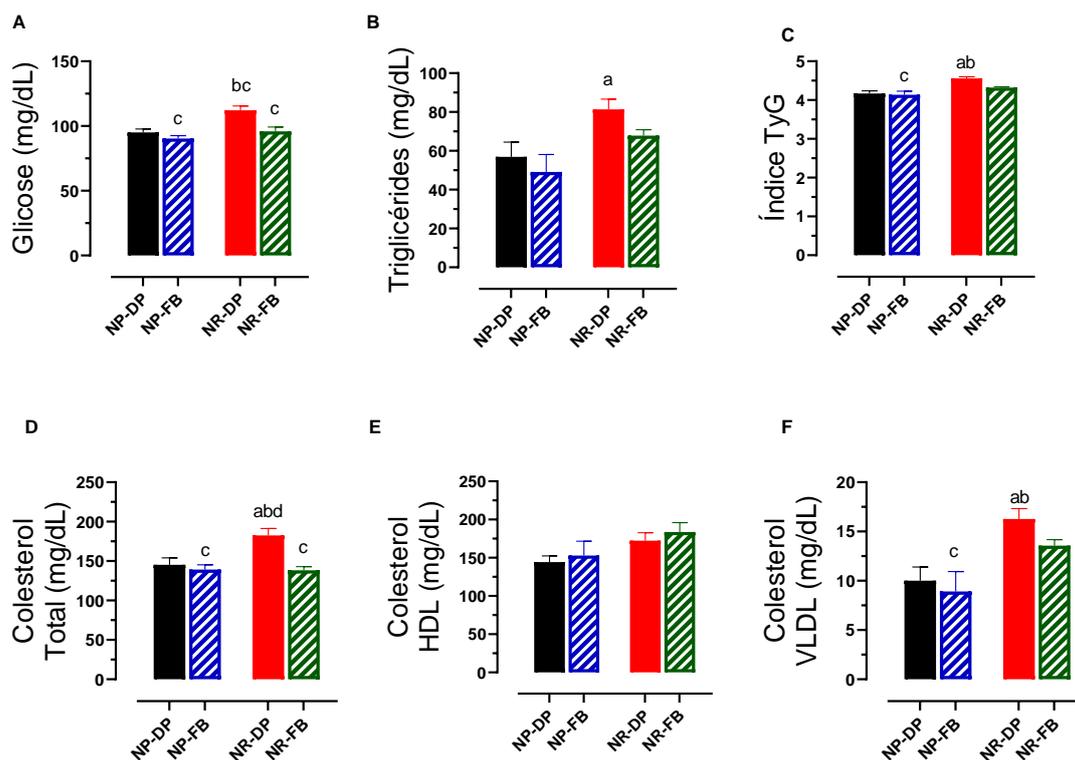


Figura 7. Efeito da dieta suplementada com feijão sobre parâmetros bioquímicos da prole adulta. (A) glicose, (B) triglicérides, (C) índice TyG, (D) colesterol total, (E) colesterol HDL, (F) colesterol VLDL. Os dados representam a média \pm EPM de 12 ratos por grupo experimental, oriundos de pelo menos 4 ninhadas diferentes. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos experimentais, analisados por meio de one-way ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni, onde a) grupo NP-DP, ninhada padrão alimentada com dieta padrão; b) NP-FB, ninhada padrão alimentada com dieta suplementada com feijão branco; c) NR-DP, ninhada reduzida alimentada com dieta padrão; d) NR-FB, ninhada reduzida alimentada com dieta suplementada com feijão branco.

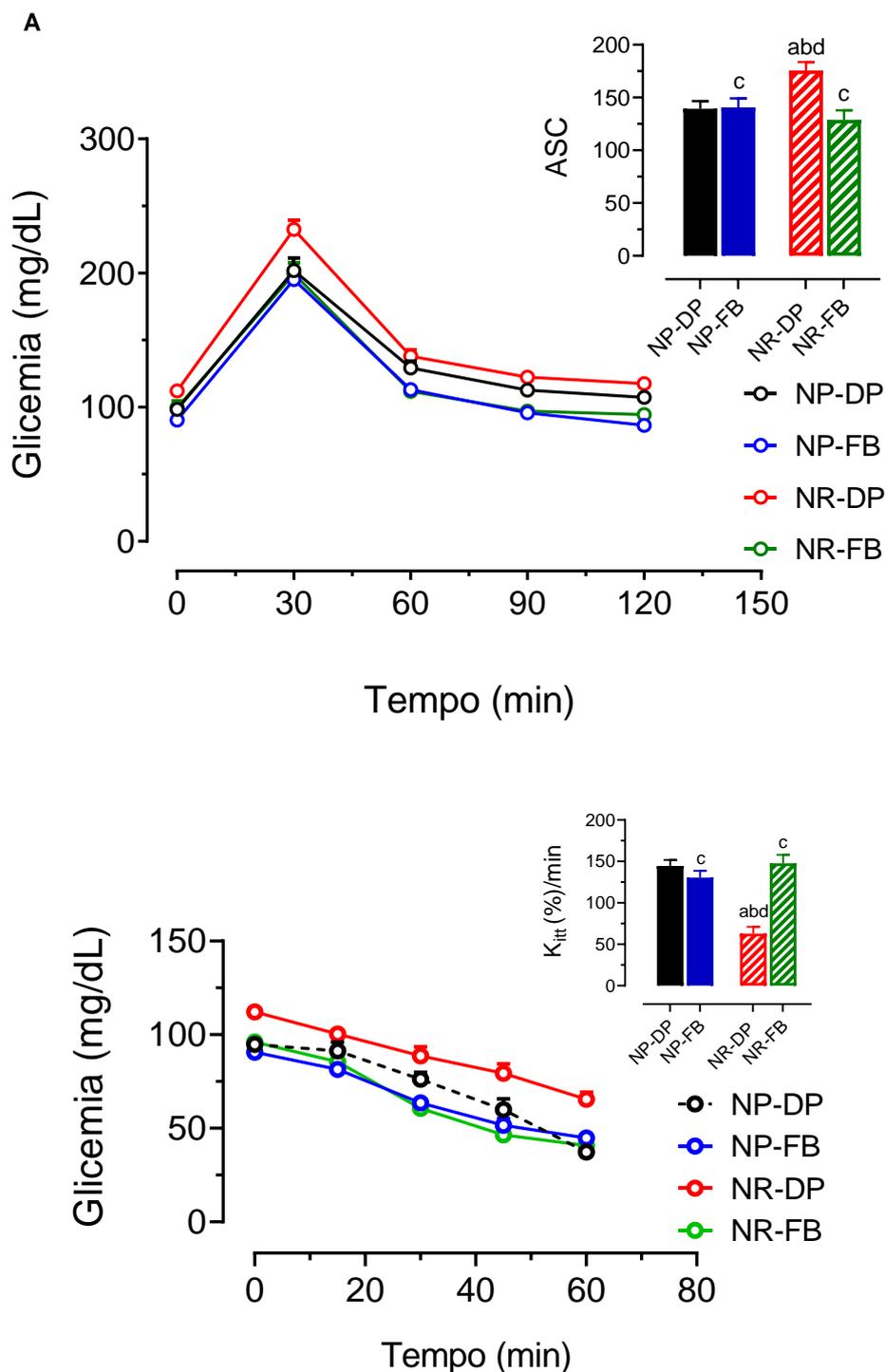


Figura 8. Homeostase glicêmica-insulinêmica através dos testes de tolerância à glicose (ipGTT, A) e insulina (ipITT, B). Os dados representam a média \pm EPM de 12 ratos, oriundos de pelo menos 3 ninhadas diferentes, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguido de pós-teste de Bonferroni para ipGTT e pós-teste de Tukey para ipITT. O inserto no lado superior direito representa a área sob a curva (ASC) glicêmica durante o ipGTT. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos experimentais, onde a) grupo NP-DP, ninhada padrão alimentada com dieta padrão; b) NP-FB, ninhada padrão alimentada com dieta suplementada com feijão branco; c) NR-DP, ninhada reduzida alimentada com dieta padrão; d) NR-FB, ninhada reduzida alimentada com dieta suplementada com feijão branco.

4.8. Parâmetros biométricos da prole adulta

Como mostrado na Tabela 3, ao término do período experimental, aos 100 dias de vida, quando comparados ao grupo NP-DP, os ratos NR-DP apresentaram fenótipo obeso com maior peso corporal (20,93%, $P < 0,001$) bem como também maior índice de adiposidade (48,28%, $P < 0,001$), sem alterações no índice de massa magra e índice de Lee ($P > 0,05$).

Contudo, quando comparados aos ratos NR-DP, os ratos NR-FB apresentam uma redução de 13,91% no peso corporal ($P < 0,05$), menor índice de adiposidade em 25,12% ($P < 0,001$) e menor índice de Lee em 4,09 % ($P < 0,05$), no entanto sem alterações no índice de massa magra ($P > 0,05$).

Sendo que no grupo NP-FB *versus* NP-DP não houve uma diferença estatística entre os grupos quanto ao peso corporal, índices de massa magra e adiposidade ($P > 0,05$).

Tabela 3. Efeito da dieta suplementada com feijão branco sobre parâmetros biométricos da prole adulta.

Parâmetros biométricos	NP-DP	NP-FB	NR-DP	NR-FB
Peso corporal (g)	364,46 ± 6,14	351,4 ± 4,08 ^{cd}	440,7 ± 2,016 ^{ab}	379,4 ± 5,93 ^{bc}
Índice de adiposidade (g/100g pc)	4,353 ± 0,54	4,220 ± 0,14 ^c	6,450 ± 0,37 ^{abd}	4,830 ± 0,20 ^c
Índice de massa magra (g/100g pc)	0,098 ± 0,002	0,104 ± 0,003	0,101 ± 0,010	0,107 ± 0,005
Índice de Lee	0,343 ± 0,001	0,340 ± 0,002	0,354 ± 0,003 ^b	0,340 ± 0,002 ^c

Os dados representam a média ± EPM de 24 a 28 ratos, oriundos de 4 ninhadas diferentes no grupo NP e de 15 ratos, oriundos de 5 ninhadas diferentes no grupo NR, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguido de pós teste de Bonferroni. As letras sobrepostas aos valores representam diferença estatística entre os grupos experimentais. a) grupo NP-DP, ninhada padrão alimentada com dieta padrão; b) NP-FB, ninhada padrão alimentada com dieta suplementada com feijão branco; c) NR-DP, ninhada reduzida alimentada com dieta padrão; d) NR-FB, ninhada reduzida alimentada com dieta suplementada com feijão branco.

4.9. Avaliação dos marcadores inflamatórios hipotalâmicos

Como pode ser visto na figura 9, quanto aos marcadores pró-inflamatórios hipotalâmicos, quando comparados aos ratos NP-DP, os ratos NR-DP apresentaram níveis maiores de TNF- α (47,52%, $P < 0,01$), de IL-6 (85,61%, $P < 0,001$) e de IL-1 β (43,21%, $P < 0,01$). Por outro lado, os ratos NR-FB, quando comparados aos ratos NR-DP, apresentaram redução em todos esses parâmetros, observando-se redução de 30,27% nos níveis de TNF- α ($P < 0,05$), de 26,49% nos níveis de IL-6 ($P < 0,05$) e de 33,07% nos níveis de IL-1 β ($P < 0,01$).

Quanto aos parâmetros relativos às citocinas pró-inflamatórias, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos NP-DP e NP-FB, em todos os parâmetros avaliados ($P > 0,05$, Figura 8). Bem como também não foram observadas

diferenças estatísticas entre os grupos, quanto aos níveis hipotalâmicos de IL-10 ($P > 0,05$, Figura 9).

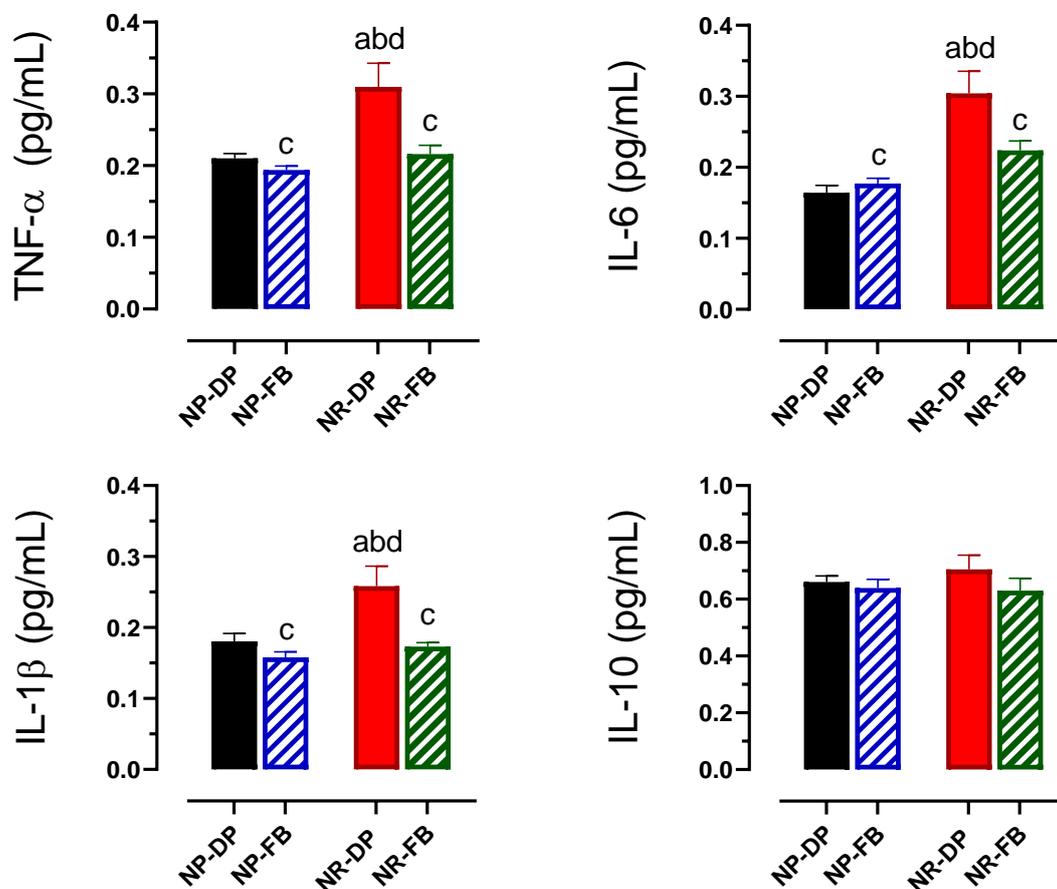


Figura 9. Marcadores inflamatórios hipotalâmicos. Os dados representam a média \pm EPM de 6 a 8 amostras hipotalâmicas de ratos oriundos de pelo menos 3 ninhadas diferentes, as quais foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni. As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos experimentais, onde a) grupo NP-DP, ninhada padrão alimentada com dieta padrão; b) NP-FB, ninhada padrão alimentada com dieta suplementada com feijão branco; c) NR-DP, ninhada reduzida alimentada com dieta padrão; d) NR-FB, ninhada reduzida alimentada com dieta suplementada com feijão branco.

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho, apresentamos o efeito de uma dieta funcional (suplementada com 2,5% de feijão branco), como ferramenta não farmacológica contra a instalação de disfunções do metabolismo energético. Ainda pontuamos que a superalimentação precoce, desenvolveu nos neonatos um fenótipo obeso e hiperfágico, já na infância, evidências que corroboram achados já bem característicos desse modelo, quando adultos.

Aqui, é válido ressaltar que nosso grupo está mostrando pela primeira vez esse fenótipo de hiperfagia já nos primeiros dias de vida, o que pode estar diretamente associado a alterações no sistema neuroendócrino, principalmente em vias envolvidas na homeostase energética hipotalâmica, devido ao fenômeno da programação metabólica, como previamente reportado (PLAGEMANN, 2008; PLAGEMANN *et al.*, 2009).

Durante a fase de lactação, o neonato vive um período bastante crítico no que diz respeito ao seu neurodesenvolvimento. Nesta fase, o neonato está passando por um processo de maturação das conexões neuronais e sinalização neuroendócrina hipotalâmica (LESAGE *et al.*, 2006; PLAGEMANN *et al.*, 2010), incluindo alterações no eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), bem como em vias autonômicas envolvidas no processo de regulação do balanço energético (BOURET; SIMERLY, 2006; HABBOUT *et al.*, 2013).

Considerando que esses processos se estendem até a metade da lactação (MAROUSEZ *et al.*, 2019), alterações nutricionais tais como as que foram observadas na composição do leite materno em nosso trabalho são fatores potenciais para promover mudanças que podem programar o surgimento de doenças metabólicas como as que aqui observamos nos ratos NR.

Mesmo não tendo sido submetidas a algum tipo de estresse direto, exceto o possível estresse advindo da redução de sua prole a apenas três filhotes durante a lactação, as ratas NR apresentaram-se hipofágicas e ingeriram menor quantidade hídrica. Em adição, observamos que o leite destas ratas foi mais calórico, contendo maior teor de gordura, maior nível de glicose, triglicérides e colesterol total, indo de encontro aos achados anteriores (SAITO *et al.*, 2005), onde demonstraram que a ingestão alimentar e hídrica pelas mães tende a ser proporcional ao tamanho da sua ninhada.

Assim, é compreensível aceitar que a programação das disfunções metabólicas em ratos provenientes de ninhada reduzida, estar relacionada a fatores outros que vão além da superoferta alimentar que modula um comportamento hiperfágico, mas também a alterações na composição do leite. Além disso, evidenciamos que o fato de reduzir a ninhada para três filhotes é suficiente para causar alterações em parâmetros biométricos maternos, como já apontado em estudo prévio sobre parâmetros morfológicos em glândulas mamárias destas ratas (XAVIER *et al.*, 2019).

Os animais NR, apresentaram maior ganho de peso corporal em comparação aos ratos do grupo controle, o que está diretamente associado a maior ingestão de um leite mais calórico. Quando analisamos a ingestão de leite ao 6º e 11º dias de vida, os ratos NR demonstraram maior ingestão, o que pode ser explicado por uma maior disponibilidade de tetas e assim acesso ao leite, o que proporciona essa hiperfagia precoce (CUNHA *et al.*, 2009), em contrapartida no 16º dia de lactação os animais NR tiveram uma ingestão menor em relação ao grupo controle, contudo isso não foi suficiente para impedir a instalação de obesidade precoce.

As mudanças na composição de macronutrientes no leite das mães nesse período pode ter contribuído para o aumento do peso corporal, corroborando com os achados de Mozeš, Šefčíková e Raček (2014) induzindo a prole à obesidade e suas comorbidades relacionadas em longo prazo como efeitos da programação precoce (FIOROTTO *et al.*, 1991; XAVIER *et al.*, 2019).

Aqui observamos que os animais NR se mantiveram em sobrepeso ao longo de todo o período pós-desmame, bem como também se mantiveram hiperfágicos ao longo desse mesmo período, o que pode ser decorrente de disfunções no ajuste hipotalâmico ocorridas durante a fase de aleitamento. Assim, muito possivelmente, o desenvolvimento de ganho de peso e a hiperfagia se mantêm por toda a vida adulta, o que pode estar diretamente relacionado ao aumento da metilação do promotor do gene *Pomc*, de modo a promover uma menor expressão do neuropeptídeo hipotalâmico POMC, como previamente reportado (PLAGEMANN *et al.*, 2010).

Quanto a eficácia da suplementação dietética com o feijão branco, nossos dados mostram que houve efeito benéfico da suplementação com feijão branco em impedir um maior ganho de peso corporal nos animais NR que ingeriram essa dieta, os quais apresentaram um menor acúmulo de adiposidade, e ao mesmo tempo mostrou índice de adiposidade similar ao do grupo NP-DP.

Provavelmente isso se dá pela ação da faseolamina diminuindo a atividade da α -amilase, uma vez que essa ação já é bem relatada em alguns estudos clínicos e experimentais (BARRETT; UDANI, 2011; HANGEN; BENNINK, 2002) Já que a α -amilase é responsável por realizar a quebra dos carboidratos presentes nos alimentos, a faseolamina presente no feijão pode estar contribuindo para uma menor absorção de glicose e conseqüentemente redução dos estoques de gordura visceral em nosso modelo. Como já reportado na literatura, quanto mais tempo os ratos são expostos a ação da faseolamina menos eles ingerem o alimento (HARIKUMAR *et al.*, 2005).

Durante o teste de preferência alimentar todos os ratos, de ambos os grupos NR e NP que vinham ingerindo a dieta adicionada ou não de feijão branco, preferiram a ração padrão para roedores. Diante deste dado, temos a hipótese de que devido a ração acrescida com feijão branco ter tido a adição do feijão branco cru, a mesma pode ser menos palatável em relação a ração padrão.

No entanto esse achado contradiz o que foi encontrado por Fantini *et al.* (2009) onde observaram em estudo com camundongos CD1 tratados de forma aguda com um extrato de feijão branco e em seguida, expostos a acesso ilimitado à pellets de alimentos regulares, biscoitos amanteigados, bebida de leite condensado e bebida com sabor de chocolate, concluindo que o extrato de *Phaseolus vulgaris* parece exercer um efeito de redução mais forte nas propriedades hedônicas (palatáveis) dos alimentos, ao invés das propriedades calóricas.

Em relação à homeostase glicêmica, o modelo de redução de ninhada foi eficaz em programar ratos adultos à hiperglicemia, e intolerantes à glicose. Nossos dados nos levam a sugerir que esses resultados sejam decorrentes da resistência periférica à insulina, uma vez que ao serem submetidos ao ipITT, bem como ao analisarmos o cálculo do índice TyG, observamos que os ratos NR apresentaram menor sensibilidade periférica à insulina. Por outro lado, a suplementação dietética com feijão branco foi eficaz em reverter, nos ratos NR, tanto o quadro de hiperglicemia de jejum quanto a intolerância à glicose e resistência à insulina, fato que sugere que a ingestão regular do feijão branco promove efeitos que vão muito além de sua ação sobre a inibição da α -amilase, por exemplo.

Dados semelhantes foram encontrados em estudos similares, nos quais ofertaram o extrato do feijão branco antes da dieta para avaliar como seria a absorção dos carboidratos, concluindo que esse bioativo tem a capacidade de retardar o metabolismo dos carboidratos reduzindo os níveis da glicose pós-prandial (BARRETT; UDANI,

2011; FANTINI *et al.*, 2009; LAYER *et al.*, 1986). Isso nos leva a sugerir que o feijão branco, como suplemento alimentar, exerce papel protetor sobre a homeostase glicêmica, possivelmente por modular vias diretamente envolvidas na captação de glicose, promovendo maior sensibilidade periférica à insulina, seja por meio do receptor da insulina ou mesmo por meio de ativadores dos translocadores tipo 4 de glicose (GLUT4), porém estudos futuros precisam ser desenvolvidos para melhor compreender essa ação molecular.

O modelo de supernutrição precoce que reproduzimos têm programado um perfil lipídico alterado, com aumento dos níveis séricos de colesterol total e suas frações levando ao um leve desequilíbrio nos níveis lipídicos o qual, muito provavelmente está associado ao desenvolvimento da resistência à insulina periférica demonstrado em estudos anteriores (BEI *et al.*, 2015; MANCO *et al.*, 2004).

Já sabemos que o aumento na gordura visceral está diretamente relacionado à síndrome metabólica, ao desenvolvimento de resistência à insulina, hipertensão e um maior risco de doenças cardiovasculares (JOSSE *et al.*, 2020; RIBEIRO FILHO *et al.*, 2006) e que estas disfunções podem estar associadas a um processo inflamatório crônico de baixo grau, o qual se origina inicialmente no tecido adiposo branco, mas que pode atingir diferentes tecidos, inclusive o encéfalo (KAWAI *et al.*, 2021)

Em nosso estudo, observamos que os ratos NR apresentam hiperglicemia, intolerância à glicose e resistência insulínica, tanto nos tecidos periféricos quanto no hipotálamo, essas disfunções metabólicas são condizentes com os achados onde demonstramos que os ratos NR também apresentam elevada quantidade de IL-6, IL-1- β e TNF- α hipotalâmica, sem alterações nos níveis de IL-10, comprovando haver nestes ratos o desenvolvimento de um processo inflamatório de baixo grau no hipotálamo. Diante disso, sugere-se que provavelmente essa inflamação esteja contribuindo para o desenvolvimento da resistência local à ação da insulina observada em nosso estudo. Como já demonstrado na literatura, a supernutrição perinatal é um fator preponderante em induzir o desenvolvimento do processo inflamatório, tal como é o processo inflamatório crônico de baixo grau intrinsecamente associado ao desenvolvimento de resistência à insulina (DROR *et al.*, 2017; HOLMES, 2017; KAYSER *et al.*, 2015). De modo interessante, aqui mostramos pela primeira vez que a ingestão regular de uma dieta contendo feijão branco é eficaz em impedir o desenvolvimento da resistência central à insulina, fato que parece estar diretamente

associado ao não desenvolvimento de inflamação hipotalâmica de baixo grau observada em ratos NR que não se alimentaram com dieta contendo o feijão branco.

Diante de tais evidências, pode-se postular que os benefícios oriundos do uso de alimentos funcionais como moduladores do estado de saúde, é de grande relevância para promover o bem estar da população, em especial por favorecer a manutenção da homeostase do metabolismo energético, com grande potencial em atenuar o desenvolvimento de doenças como a obesidade.

6 CONCLUSÃO

A suplementação dietética com feijão branco foi capaz de impedir um maior acúmulo dos depósitos de gordura visceral, melhorar a homeostase glicêmica e insulinêmica e atenuar o processo inflamatório hipotalâmico em ratos oriundos de ninhada reduzida. Ademais, o modelo NR aqui desenvolvido, mostrou maior ingestão de leite materno durante fase inicial do período lactacional, o qual associado a um leite mais calórico implica serem estes fatores cruciais desencadeando situação de obesidade e comprometimento de funções metabólicas na vida adulta nesses animais.

Em síntese, é importante destacar que o aleitamento materno durante o estágio inicial do desenvolvimento da criança é essencial, já que é o alimento ideal que supre todas as necessidades nutricionais até certo momento do recém-nascido, no entanto deve ser ofertado apenas o leite materno em livre demanda por pelo menos os 6 meses de vida do bebê, evitando inserir fórmulas infantis sem horários e quantidades estabelecidas por profissional ou a introdução da alimentação precoce, a fim de evitar disfunções metabólicas tais como a obesidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABESO. **Associação Brasileira para o Estudo da Obesidade e da Síndrome metabólica. Mapa da Obesidade.** São Paulo, 2022. Disponível em: <https://abeso.org.br/obesidade-e-sindrome-metabolica/mapa-da-obesidade/>. Acesso em: 03 jun 2022.

ALMEIDA, D. L.; PAVANELLO, A.; SAAVEDRA, L. P.; PEREIRA, T. S.; DE CASTRO-PRADO, M. A. A. *et al.* Environmental monitoring and the developmental origins of health and disease. **J Dev Orig Health Dis**, 10, n. 6, p. 608-615, Dec 2019.

APOVIAN, C. M. Obesity: definition, comorbidities, causes, and burden. **Am J Manag Care**, 22, n. 7 Suppl, p. s176-185, Jun 2016.

AUBERT, R.; SUQUET, J. P.; LEMONNIER, D. Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice. **J Nutr**, 110, n. 4, p. 649-661, Apr 1980.

BARKER, D. J.; BULL, A. R.; OSMOND, C.; SIMMONDS, S. J. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. **BMJ**, 301, n. 6746, p. 259-262, Aug 4 1990.

BARKER, D. J.; WINTER, P. D.; OSMOND, C.; MARGETTS, B.; SIMMONDS, S. J. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. **Lancet**, 2, n. 8663, p. 577-580, Sep 9 1989.

BARRETT, M. L.; UDANI, J. K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. **Nutr J**, 10, p. 24, Mar 17 2011.

BAUTISTA, C. J.; BAUTISTA, R. J.; MONTANO, S.; REYES-CASTRO, L. A.; RODRIGUEZ-PENA, O. N. *et al.* Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. **Br J Nutr**, p. 1-11, Jul 26 2019.

BEI, F.; JIA, J.; JIA, Y. Q.; SUN, J. H.; LIANG, F. *et al.* Long-term effect of early postnatal overnutrition on insulin resistance and serum fatty acid profiles in male rats. **Lipids Health Dis**, 14, p. 96, Aug 26 2015.

BOURET, S. G.; SIMERLY, R. B. Developmental programming of hypothalamic feeding circuits. **Clin Genet**, 70, n. 4, p. 295-301, Oct 2006.

BROWN, R. E. Could there be a fine-tuning role for brain-derived adipokines in the regulation of bodyweight and prevention of obesity? **Mcgill J Med**, 11, n. 2, p. 177-184, Jul 2008.

CAMARGO, R. L.; TORREZAN, R.; DE OLIVEIRA, J. C.; BRANCO, R. C.; BARELLA, L. F. *et al.* An increase in glucose concentration in the lateral ventricles of the brain induces changes in autonomic nervous system activity. **Neurol Res**, 35, n. 1, p. 15-21, Jan 2013.

CRYER, A.; JONES, H. M. The development of white adipose tissue. Effect of litter size on the lipoprotein lipase activity of four adipose-tissue depots, serum immunoreactive insulin and tissue cellularity during the first year of life in male and female rats. **Biochem J**, 186, n. 3, p. 805-815, Mar 15 1980.

CUNHA, A. C.; PEREIRA, R. O.; PEREIRA, M. J.; SOARES VDE, M.; MARTINS, M. R. *et al.* Long-term effects of overfeeding during lactation on insulin secretion--the role of GLUT-2. **J Nutr Biochem**, 20, n. 6, p. 435-442, Jun 2009.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. **Neuroreport**, 11, n. 12, p. 2795-2798, Aug 21 2000.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Inhibition by insulin of hypothalamic VMN neurons in rats overweight due to postnatal overfeeding. **Neuroreport**, 12, n. 15, p. 3201-3204, Oct 29 2001.

DE ALMEIDA, D. L.; FABRICIO, G. S.; TROMBINI, A. B.; PAVANELLO, A.; TOFOLO, L. P. *et al.* Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. **Cell Physiol Biochem**, 32, n. 6, p. 1621-1630, 2013.

DE OLIVEIRA, J. C.; GOMES, R. M.; MIRANDA, R. A.; BARELLA, L. F.; MALTA, A. *et al.* Protein Restriction During the Last Third of Pregnancy Malprograms the Neuroendocrine Axes to Induce Metabolic Syndrome in Adult Male Rat Offspring. **Endocrinology**, 157, n. 5, p. 1799-1812, May 2016.

DE OLIVEIRA, J. C.; LUDEMANN CAMARGO, R.; BARELLA, L. F.; CHAVES SOUTO BRANCO, R.; GRAVENA, C. *et al.* Anesthetic-induced transient hyperglycemia and insulin resistance do not depend on the sympathoadrenal axis. **Minerva Endocrinol**, 38, n. 4, p. 379-388, Dec 2013.

DEBOUCK, D. G. *In*: VOYEST, A. v. S. a. O. (Ed.). **Common beans: research for crop improvement**, 1991. cap. 2, p. 55-118. (Systematics and morphology).

DEPEC. **Departamento de Pesquisas e Estudos Econômicos. Feijão – Junho 2017.** Economia em Dia - Bradesco, 2018. Disponível em: <https://www.economiaemdia.com.br/EconomiaEmDia/pdf/infset_feijao.pdf>. Acesso em: 02 de Jun 2019.

DEPETERS, E. J.; HOVEY, R. C. Methods for collecting milk from mice. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 14, n. 4, p. 397-400, Dec 2009.

DETMANN, E.; SOUZA, M. d.; VALADARES FILHO, S. d. C.; QUEIROZ, A. d.; BERCHIELLI, T. *et al.* Métodos para análise de alimentos. 214, 2012.

DONNER, D. G.; ELLIOTT, G. E.; BECK, B. R.; BULMER, A. C.; DU TOIT, E. F. Impact of Diet-Induced Obesity and Testosterone Deficiency on the Cardiovascular System: A Novel Rodent Model Representative of Males with Testosterone-Deficient Metabolic Syndrome (TDMetS). **PLoS One**, 10, n. 9, p. e0138019, 2015.

DROR, E.; DALMAS, E.; MEIER, D. T.; WUEEST, S.; THEVENET, J. *et al.* Postprandial macrophage-derived IL-1beta stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. **Nat Immunol**, 18, n. 3, p. 283-292, Mar 2017.

DRUCE, M.; BLOOM, S. R. The regulation of appetite. **Arch Dis Child**, 91, n. 2, p. 183-187, Feb 2006.

EL, S. N.; KARAKAYA, S. Radical scavenging and iron-chelating activities of some greens used as traditional dishes in Mediterranean diet. **Int J Food Sci Nutr**, 55, n. 1, p. 67-74, Feb 2004.

FANTINI, N.; CABRAS, C.; LOBINA, C.; COLOMBO, G.; GESSA, G. L. *et al.* Reducing effect of a Phaseolus vulgaris dry extract on food intake, body weight, and glycemia in rats. **J Agric Food Chem**, 57, n. 19, p. 9316-9323, Oct 14 2009.

FIOROTTO, M. L.; BURRIN, D. G.; PEREZ, M.; REEDS, P. J. Intake and use of milk nutrients by rat pups suckled in small, medium, or large litters. **Am J Physiol**, 260, n. 6 Pt 2, p. R1104-1113, Jun 1991.

FONSECA-ALANIZ, M. H.; TAKADA, J.; ALONSO-VALE, M. I.; LIMA, F. B. [The adipose tissue as a regulatory center of the metabolism]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 50, n. 2, p. 216-229, Apr 2006.

FONSECA RAPOSO, H. Tecido adiposo: suas cores e versatilidade . HU Revista, [S. l.], v. 46, p. 1–12, 2020. DOI: 10.34019/1982-8047.2020.v46.31268. Disponível em: <https://periodicos.ufjf.br/index.php/hurevista/article/view/31268>. Acesso em: 24 out. 2022.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin Chem**, 18, n. 6, p. 499-502, Jun 1972.

FUKUHARA, A.; MATSUDA, M.; NISHIZAWA, M.; SEGAWA, K.; TANAKA, M. *et al.* Visfatin: a protein secreted by visceral fat that mimics the effects of insulin. **Science**, 307, n. 5708, p. 426-430, Jan 21 2005.

GLUCKMAN, P. D.; CUTFIELD, W.; HOFMAN, P.; HANSON, M. A. The fetal, neonatal, and infant environments-the long-term consequences for disease risk. **Early Hum Dev**, 81, n. 1, p. 51-59, Jan 2005.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. The developmental origins of the metabolic syndrome. **Trends Endocrinol Metab**, 15, n. 4, p. 183-187, May-Jun 2004.

GUARDA, D. S.; LISBOA, P. C.; DE OLIVEIRA, E.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; DE MOURA, E. G. *et al.* Flaxseed oil during lactation changes milk and body composition in male and female suckling pups rats. **Food Chem Toxicol**, 69, p. 69-75, Jul 2014.

HABBOU, A.; LI, N.; ROCHETTE, L.; VERGELY, C. Postnatal overfeeding in rodents by litter size reduction induces major short- and long-term pathophysiological consequences. **J Nutr**, 143, n. 5, p. 553-562, May 2013.

HANGEN, L.; BENNINK, M. R. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Nutr Cancer**, 44, n. 1, p. 60-65, 2002.

HARIKUMAR, K. B.; JESIL, A. M.; SABU, M. C.; KUTTAN, R. A preliminary assessment of the acute and subchronic toxicity profile of phase2: an alpha-amylase inhibitor. **Int J Toxicol**, 24, n. 2, p. 95-102, Mar-Apr 2005.

HEIJMANS, B. T.; TOBI, E. W.; STEIN, A. D.; PUTTER, H.; BLAUW, G. J. *et al.* Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 44, p. 17046-17049, Nov 4 2008.

HEINDEL, J. J.; BALBUS, J.; BIRNBAUM, L.; BRUNE-DRISSE, M. N.; GRANDJEAN, P. *et al.* Developmental Origins of Health and Disease: Integrating Environmental Influences. **Endocrinology**, 156, n. 10, p. 3416-3421, Oct 2015.

HOLMES, D. Immunometabolism: Physiologic role of IL-1beta in glucose homeostasis. **Nat Rev Endocrinol**, 13, n. 3, p. 128, Mar 2017.

JONES, D. B. **Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins.** US Department of Agriculture, 1931. v. 183).

JOSSE, M.; RIGAL, E.; ROSENBLATT-VELIN, N.; ROCHETTE, L.; ZELLER, M. *et al.* Programming of Cardiovascular Dysfunction by Postnatal Overfeeding in Rodents. **Int J Mol Sci**, 21, n. 24, Dec 11 2020.

KAWAI, T.; AUTIERI, M. V.; SCALIA, R. Adipose tissue inflammation and metabolic dysfunction in obesity. **Am J Physiol Cell Physiol**, 320, n. 3, p. C375-c391, Mar 1 2021.

KAYSER, B. D.; GORAN, M. I.; BOURET, S. G. Perinatal overnutrition exacerbates adipose tissue inflammation caused by high-fat feeding in C57BL/6J mice. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0121954, 2015.

LANDSTROM, E.; HURSTI, U. K.; MAGNUSSON, M. "Functional foods compensate for an unhealthy lifestyle". Some Swedish consumers' impressions and perceived need of functional foods. **Appetite**, 53, n. 1, p. 34-43, Aug 2009.

LAYER, P.; ZINSMEISTER, A. R.; DIMAGNO, E. P. Effects of decreasing intraluminal amylase activity on starch digestion and postprandial gastrointestinal function in humans. **Gastroenterology**, 91, n. 1, p. 41-48, Jul 1986.

LEITE, E. D.; FREITAS, E. S.; SOUZA CDE, A.; OCARINO NDE, M.; CASSALI, G. D. *et al.* [Proliferation, apoptosis and mammary gland histomorphometry of thyroxine-treated rats on lactation and after weaning and development of offspring]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 51, n. 6, p. 1000-1006, Aug 2007.

LESAGE, J.; SEBAAI, N.; LEONHARDT, M.; DUTRIEZ-CASTELOOT, I.; BRETON, C. *et al.* Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Stress**, 9, n. 4, p. 183-198, Dec 2006.

LIENER, I. E.; DONATUCCI, D. A.; TARCZA, J. C. Starch blockers: a potential source of trypsin inhibitors and lectins. **Am J Clin Nutr**, 39, n. 2, p. 196-200, Feb 1984.

LOI, B.; FANTINI, N.; COLOMBO, G.; GESSA, G. L.; RIVA, A. *et al.* Reducing effect of an extract of *Phaseolus vulgaris* on food intake in mice--focus on highly palatable foods. **Fitoterapia**, 85, p. 14-19, Mar 2013.

LUCAS, A.; GIBBS, J. A.; LYSTER, R. L.; BAUM, J. D. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. **Br Med J**, 1, n. 6119, p. 1018-1020, Apr 22 1978.

LUTZ, T. A.; WOODS, S. C. Overview of animal models of obesity. **Curr Protoc Pharmacol**, Chapter 5, p. Unit5 61, Sep 2012.

MACCIONI, P.; COLOMBO, G.; RIVA, A.; MORAZZONI, P.; BOMBARDELLI, E. *et al.* Reducing effect of a *Phaseolus vulgaris* dry extract on operant self-administration of a chocolate-flavoured beverage in rats. **Br J Nutr**, 104, n. 5, p. 624-628, Sep 2010.

MANCO, M.; CALVANI, M.; MINGRONE, G. Effects of dietary fatty acids on insulin sensitivity and secretion. **Diabetes Obes Metab**, 6, n. 6, p. 402-413, Nov 2004.

MANDY, M.; NYIRENDA, M. Developmental Origins of Health and Disease: the relevance to developing nations. **Int Health**, 10, n. 2, p. 66-70, Mar 1 2018.

MARINE-CASADO, R.; DOMENECH-COCA, C.; DEL BAS, J. M.; BLADE, C.; AROLA, L. *et al.* Intake of an Obesogenic Cafeteria Diet Affects Body Weight, Feeding Behavior, and Glucose and Lipid Metabolism in a Photoperiod-Dependent Manner in F344 Rats. **Front Physiol**, 9, p. 1639, 2018.

MARIOTTI, F.; TOME, D.; MIRAND, P. P. Converting nitrogen into protein--beyond 6.25 and Jones' factors. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 48, n. 2, p. 177-184, Feb 2008.

MAROUSEZ, L.; LESAGE, J.; EBERLE, D. Epigenetics: Linking Early Postnatal Nutrition to Obesity Programming? **Nutrients**, 11, n. 12, Dec 5 2019.

MARTIN, S. S.; GIUGLIANO, R. P.; MURPHY, S. A.; WASSERMAN, S. M.; STEIN, E. A. *et al.* Comparison of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Assessment by Martin/Hopkins Estimation, Friedewald Estimation, and Preparative Ultracentrifugation: Insights From the FOURIER Trial. **JAMA Cardiol**, 3, n. 8, p. 749-753, Aug 1 2018.

MATHIAS, P. C. F.; MIRANDA, G. D. S.; BARELLA, L. F.; MIRANDA, R. A.; PAVANELLO, A. *et al.* Cholinergic-pathway-weakness-associated pancreatic islet dysfunction: a low-protein-diet imprint effect on weaned rat offspring. **J Dev Orig Health Dis**, 11, n. 5, p. 484-491, Oct 2020.

MAZUR, C. E. Efeito do Feijão Branco (*Phaseolus vulgaris* L.) na perda de peso. **RBNE-Revista Brasileira de Nutrição Esportiva**, 8, n. 48, p. 404-411, 2014.

MERRIL, A. L.; WATT, B. K. **Energy value of Foods, basis and derivation**

Agriculture research service. United States Department of Agriculture: 1973.

MIRANDA, R. A.; DA SILVA FRANCO, C. C.; DE OLIVEIRA, J. C.; BARELLA, L. F.; TOFOLO, L. P. *et al.* Cross-fostering reduces obesity induced by early exposure to monosodium glutamate in male rats. **Endocrine**, 55, n. 1, p. 101-112, Jan 2017.

MONK, J. M.; WU, W.; LEPP, D.; PAULS, K. P.; ROBINSON, L. E. *et al.* Navy Bean Supplementation in Established High-Fat Diet-Induced Obesity Attenuates the Severity of the Obese Inflammatory Phenotype. **Nutrients**, 13, n. 3, Feb 26 2021.

MONTANI, J. P.; ANTIC, V.; YANG, Z.; DULLOO, A. Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 26 Suppl 2, p. S28-38, Sep 2002.

MOZEŠ, Š.; ŠEFČÍKOVÁ, Z.; RAČEK, L. Long-term effect of altered nutrition induced by litter size manipulation and cross-fostering in suckling male rats on development of obesity risk and health complications. **J European journal of nutrition**, 53, n. 5, p. 1273-1280, 2014.

NAKAGAWA, T.; UKAI, K.; OHYAMA, T.; GOMITA, Y.; OKAMURA, H. Effects of chronic administration of sibutramine on body weight, food intake and motor activity in neonatally monosodium glutamate-treated obese female rats: relationship of antiobesity effect with monoamines. **Exp Anim**, 49, n. 4, p. 239-249, Oct 2000.

NEIL, E. S.; MCGINLEY, J. N.; FITZGERALD, V. K.; LAUCK, C. A.; TABKE, J. A. *et al.* White Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Consumption Reduces Fat Accumulation in a Polygenic Mouse Model of Obesity. **Nutrients**, 11, n. 11, Nov 15 2019.

NOLAN, R.; SHANNON, O. M.; ROBINSON, N.; JOEL, A.; HOUGHTON, D. *et al.* It's No Has Bean: A Review of the Effects of White Kidney Bean Extract on Body Composition and Metabolic Health. **Nutrients**, 12, n. 5, May 13 2020.

NUNEZ, M. C.; BUENO, J. D.; AYUDARTE, M. V.; ALMENDROS, A.; RIOS, A. *et al.* Dietary restriction induces biochemical and morphometric changes in the small intestine of nursing piglets. **J Nutr**, 126, n. 4, p. 933-944, Apr 1996.

OBIRO, W. C.; ZHANG, T.; JIANG, B. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha-amylase inhibitor. **Br J Nutr**, 100, n. 1, p. 1-12, Jul 2008.

OPAS, B. **Organização Pan-Americana da Saúde. Desigualdade exacerba fome, desnutrição e obesidade na América Latina e no Caribe.** Brasília, 2018. Disponível em:

https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5799:desigualdade-exacerba-fome-desnutricao-e-obesidade-na-america-latina-e-no-caribe&Itemid=839. Acesso em: 01 Jun 2019.

PAXINOS, G.; KEITH B. J. FRANKLIN, M. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. Elsevier Science, 2007.

PEREIRA, L. L. S. **Estudo comparativo entre faseolamina comercial e farinha de feijao como perspectiva ao tratamento da obesidade e do diabetes mellitus tipo 2**. 2008. Tese de Doutorado. -.

PEREZ FERNANDEZ, R.; KASKI, J. C. [Interleukin-10 and coronary disease]. **Rev Esp Cardiol**, 55, n. 7, p. 738-750, Jul 2002.

PIEROZAN, P.; JERNEREN, F.; RANSOME, Y.; KARLSSON, O. The Choice of Euthanasia Method Affects Metabolic Serum Biomarkers. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 121, n. 2, p. 113-118, Aug 2017.

PLAGEMANN, A. A matter of insulin: developmental programming of body weight regulation. **J Matern Fetal Neonatal Med**, 21, n. 3, p. 143-148, Mar 2008.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; BRUNN, M.; HARDER, A.; ROEPKE, K. *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **J Physiol**, 587, n. Pt 20, p. 4963-4976, Oct 15 2009.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; RAKE, A.; VOITS, M.; FINK, H. *et al.* Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, and syndrome x-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. **Brain Res**, 836, n. 1-2, p. 146-155, Jul 31 1999.

PLAGEMANN, A.; ROEPKE, K.; HARDER, T.; BRUNN, M.; HARDER, A. *et al.* Epigenetic malprogramming of the insulin receptor promoter due to developmental overfeeding. **J Perinat Med**, 38, n. 4, p. 393-400, Jul 2010.

POLLAK, A.; SUSA, J. B.; STONESTREET, B. S.; SCHWARTZ, R.; OH, W. Phosphoenolpyruvate carboxykinase in experimental intrauterine growth retardation in rats. **Pediatr Res**, 13, n. 3, p. 175-177, Mar 1979.

PROSKY, L.; ASP, N. G.; FURDA, I.; DEVRIES, J. W.; SCHWEIZER, T. F. *et al.* Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. **J Assoc Off Anal Chem**, 68, n. 4, p. 677-679, Jul-Aug 1985.

RIBEIRO FILHO, F. F.; MARIOSA, L. S.; FERREIRA, S. R.; ZANELLA, M. T. [Visceral fat and metabolic syndrome: more than a simple association]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 50, n. 2, p. 230-238, Apr 2006.

RIBEIRO, T. A.; TOFOLO, L. P.; MARTINS, I. P.; PAVANELLO, A.; DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* Maternal low intensity physical exercise prevents obesity in offspring rats exposed to early overnutrition. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 7634, Aug 9 2017.

RINALDI, W.; GOMES, R. M.; SCOMPARIN, D. X.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, T. A. *et al.* Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. **J Int Soc Sports Nutr**, 11, p. 25, 2014.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V. e.; ABBAS, A. K. e.; FAUSTO, N. e. **Patologia: Bases Patológicas das doenças**. 9º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RODRIGUES, A. L.; DE MOURA, E. G.; PASSOS, M. C.; TREVENZOLI, I. H.; DA CONCEICAO, E. P. *et al.* Postnatal early overfeeding induces hypothalamic higher SOCS3 expression and lower STAT3 activity in adult rats. **J Nutr Biochem**, 22, n. 2, p. 109-117, Feb 2011.

ROSEN, E. D.; SPIEGELMAN, B. M. What we talk about when we talk about fat. **Cell**, 156, n. 1-2, p. 20-44, Jan 16 2014.

SADOWSKA, J.; GEBCZYNSKI, A. K.; KONARZEWSKI, M. Metabolic risk factors in mice divergently selected for BMR fed high fat and high carb diets. **PLoS One**, 12, n. 2, p. e0172892, 2017.

SAINSBURY, A.; COONEY, G. J.; HERZOG, H. Hypothalamic regulation of energy homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 16, n. 4, p. 623-637, Dec 2002.

SAITO, T. R.; SUZUKI, M.; AOKI-KOMORI, S.; TANAKA, M. Food intake and leptin concentrations of lactating rats nursing various sized litters. **Reprod Med Biol**, 4, n. 3, p. 203-206, Sep 2005.

SALEH, S.; EL-MARAGHY, N.; REDA, E.; BARAKAT, W. Modulation of diabetes and dyslipidemia in diabetic insulin-resistant rats by mangiferin: role of adiponectin and TNF-alpha. **An Acad Bras Cienc**, 86, n. 4, p. 1935-1948, Dec 2014.

SCHERER, P. E. Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. **Diabetes**, 55, n. 6, p. 1537-1545, Jun 2006.

SCHMIDT, I.; FRITZ, A.; SCHOLCH, C.; SCHNEIDER, D.; SIMON, E. *et al.* The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 25, n. 8, p. 1168-1174, Aug 2001.

SCHWARTZ, M. W.; WOODS, S. C.; PORTE, D., Jr.; SEELEY, R. J.; BASKIN, D. G. Central nervous system control of food intake. **Nature**, 404, n. 6778, p. 661-671, Apr 6 2000.

SEIBEL, W. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 8th Edition (Standardmethoden der amerikanischen Gesellschaft für Getreidechemiker, 8. Ausgabe). Approved Methods Committee American Association of Cereal Chemists, Inc. St. Paul/Minnesota, USA. 41, n. 11, p. 443-443, 1989.

SHIMIZU, Y.; YAMAZAKI, M.; NAKANISHI, K.; SAKURAI, M.; SANADA, A. *et al.* Enhanced responses of the chorda tympani nerve to sugars in the ventromedial hypothalamic obese rat. **J Neurophysiol**, 90, n. 1, p. 128-133, Jul 2003.

SIMENTAL-MENDIA, L. E.; RODRIGUEZ-MORAN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metab Syndr Relat Disord**, 6, n. 4, p. 299-304, Dec 2008.

SINGER, K.; LUMENG, C. N. The initiation of metabolic inflammation in childhood obesity. **J Clin Invest**, 127, n. 1, p. 65-73, Jan 3 2017.

SPEAKMAN, J.; HAMBLBY, C.; MITCHELL, S.; KROL, E. Animal models of obesity. **Obes Rev**, 8 Suppl 1, p. 55-61, Mar 2007.

THOMPSON, M. D.; THOMPSON, H. J.; BRICK, M. A.; MCGINLEY, J. N.; JIANG, W. *et al.* Mechanisms associated with dose-dependent inhibition of rat mammary carcinogenesis by dry bean (*Phaseolus vulgaris*, L.). **J Nutr**, 138, n. 11, p. 2091-2097, Nov 2008.

TRAHAIR, J. F.; DEBARRO, T. M.; ROBINSON, J. S.; OWENS, J. A. Restriction of nutrition in utero selectively inhibits gastrointestinal growth in fetal sheep. **J Nutr**, 127, n. 4, p. 637-641, Apr 1997.

UAUY, R.; DIAZ, E. Consequences of food energy excess and positive energy balance. **Public Health Nutr**, 8, n. 7A, p. 1077-1099, Oct 2005.

UDANI, J.; SINGH, B. B. Blocking carbohydrate absorption and weight loss: a clinical trial using a proprietary fractionated white bean extract. **Altern Ther Health Med**, 13, n. 4, p. 32-37, Jul-Aug 2007.

UFRGS. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Tecnologias de Alimentos. ICTA - Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos.**

Matérias Primas – Leguminosas. 2019. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/afeira/materias-primas/leguminosas/feijao/consumo>. Acesso em: 03 Jun 2019.

VALASSI, E.; SCACCHI, M.; CAVAGNINI, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 18, n. 2, p. 158-168, Feb 2008.

VAN HALL, G.; STEENSBERG, A.; SACCHETTI, M.; FISCHER, C.; KELLER, C. *et al.* Interleukin-6 stimulates lipolysis and fat oxidation in humans. **J Clin Endocrinol Metab**, 88, n. 7, p. 3005-3010, Jul 2003.

VERDICH, C.; TOUBRO, S.; BUEMANN, B.; LYSGARD MADSEN, J.; JUUL HOLST, J. *et al.* The role of postprandial releases of insulin and incretin hormones in meal-induced satiety--effect of obesity and weight reduction. **Int J Obes Relat Metab Disord**, 25, n. 8, p. 1206-1214, Aug 2001.

VISHVANATH, L.; GUPTA, R. K. Contribution of adipogenesis to healthy adipose tissue expansion in obesity. **J Clin Invest**, 129, n. 10, p. 4022-4031, Oct 1 2019.

VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. [Experimental model to induce obesity in rats]. **Acta Cir Bras**, 21, n. 6, p. 425-429, Nov-Dec 2006.

WHO. **World Health Organization. Obesity and overweight.** 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 15 Jun 2021.

WILLIAMS, G.; BING, C.; CAI, X. J.; HARROLD, J. A.; KING, P. J. *et al.* The hypothalamus and the control of energy homeostasis: different circuits, different purposes. **Physiol Behav**, 74, n. 4-5, p. 683-701, Nov-Dec 2001.

WOODS, S. C.; SEELEY, R. J.; PORTE, D., Jr.; SCHWARTZ, M. W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. **Science**, 280, n. 5368, p. 1378-1383, May 29 1998.

XAVIER, J. L. P.; SCOMPARIN, D. X.; PONTES, C. C.; RIBEIRO, P. R.; CORDEIRO, M. M. *et al.* Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. **An Acad Bras Cienc**, 91, n. 1, p. e20170971, Mar 21 2019.

YOUNG, C. M.; RASMUSSEN, K. M. Effects of varying degrees of chronic dietary restriction in rat dams on reproductive and lactational performance and body composition in dams and their pups. **Am J Clin Nutr**, 41, n. 5, p. 979-987, May 1985.

ZEENI, N.; DAGHER-HAMALIAN, C.; DIMASSI, H.; FAOUR, W. H. Cafeteria diet-fed mice is a pertinent model of obesity-induced organ damage: a potential role of inflammation. **Inflamm Res**, 64, n. 7, p. 501-512, Jul 2015.

ZHU, Z.; JIANG, W.; THOMPSON, H. J. Edible dry bean consumption (*Phaseolus vulgaris* L.) modulates cardiovascular risk factors and diet-induced obesity in rats and mice. **Br J Nutr**, 108 Suppl 1, p. S66-73, Aug 2012.

8 ARTIGO

***Phaseolus vulgaris* L. as functional food improves central insulin resistance in obese rats programmed by early overfeeding**

Ester Vieira Alves^{1,2}, Tatiane Vieira Alves^{1,2}, Lauro Sergio Barrozo Junior^{1,2}, Marcos Vinícius de Freitas Ribeiro^{1,2}, Camila Luiza Rodrigues dos Santos Ricken^{1,2}, Ingridys Regina Borkenhagen^{1,2}, Bruno Vargas Teixeira Cavalheiro^{1,2}, Sabrina Trigueiro Mendonça², Ricardo de Oliveira³, Gisele Facholi Bomfim², Júlio Cezar de Oliveira^{1,2}

¹Research Group on Perinatal Programming of Metabolic Diseases: DOHaD paradigm;

²Laboratory of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Health Education and Research Center (NUPADS), Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil.

³Laboratory of Experimental Neuropsychobiology, Health Education and Research Center (NUPADS), Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil.

Correspondence to: Professor Júlio Cezar de Oliveira, PhD, Research Group on Perinatal Programming of Metabolic Diseases: DOHaD paradigm, Laboratory of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Health Education and Research Center (NUPADS), room 03, Institute of Health Sciences, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil, Alexandre Ferronato Avenue 1200, 78557-267, Sinop, MT, Brazil.

Phone: + 55 (66) 9 8142-7316

E-mail address: biojborges@gmail.com or julio.oliveira1@ufmt.br

Running title: White bean diet blocks central insulin resistance

Keywords: Functional food; hypothalamus inflammation; insulin resistance; early obesity; lactation; small litter.

Abstract

Obesity and comorbidities have been associated to several factors as early overfeeding. Early overfeeding is a programming of impaired energy metabolism that can be ameliorated through the habitual intake functional foods. Our aim was investigating the effect of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.), as diet supplementation, on glucose and metabolic homeostasis in early overfeeding male rats. For this, at post-natal day 3, litters size was adjusted to 3 pups (small litter, SL) or 8 pups per mother (normal litter, NL). The milk collection and milk intake were performed, and the weaning tookes place at 22 days old. After, rats were fed with a standard diet (NL-SD and SL-SD groups) or a white bean, at 2.5%, supplemented diet (NL-WB and SL-WB groups). Body weight, food and water intake were measured every two days. Intraperitoneal glucose and insulin tolerance, and intracerebroventricular insulin (10⁻³ mmol/L) tests were performed and euthanasia performed at adulthood. Blood, hypothalamus, visceral fat pad and lean mass were collected. Milk from SL mothers displays high content of glucose, cholesterol, triglycerides, and energy (P<0.05), as well as milk consumption by SL rat-offspring, in early stage of suckling, was higher than NL rats. SL-SD rats were obese, hyperphagic, dyslipidemic, hyperglycemic, glucose intolerant and insulin poorly sensible (P<0.05). In addition, SL-SD rats displayed central insulin resistance and higher hypothalamic pro-inflammatory (TNF- α , 43.5%; IL-6, 78.5% and IL-1 β , 50.1%, P<0.05) cytokine. The ingestion of white bean-dietary supplementation prevents obesity and glucose desregulation in early overfeeding rats. These findings can be associated with hypothalamic inflammation and insulin resistance improvement.

Introduction

The prevalence of obesity and overweight among children is growing around the world, which has been associated with many causal factors. In this regard, researchers on this field emphasize the association between insults in early life and metabolic impairment, as long-term consequence (CHOOI *et al.*, 2019; FACCHI *et al.*, 2020; HASEBE *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2021). Over the past 4 decades an accelerated growing in overweight and obesity among children, adolescents and adults has been recorded worldwide. In this respect, around of 39 million children under the age of 5 were overweight or obese in 2020, while over 340 million children and adolescents aged 5-19 were overweight or obese in 2016 (WHO, 2021).

Adversities in the maternal environment during the offspring's perinatal life (both in intrauterine life and in earlier stages of the neonate, such as the breastfeeding period) have a direct relationship with how the regulation of metabolism occurs in adulthood. In fact, changes in milk composition including metabolic hormone alterations have been put out as determinant on programming metabolism to a damaging condition in adulthood (BADILLO-SUAREZ *et al.*, 2017), once the suckling period is an important neuroendocrine plasticity window, which makes components in the milk, the major/exclusive source of nutrition for babies, an important factor programming pups for a metabolic healthy or ill status (PALOU *et al.*, 2018; PICO *et al.*, 2020).

Overfeeding during early postnatal life has been shown to favor the later development of metabolic dysfunction, which is associated with neuroendocrine hypothalamic circuitry derangement, during this critical plasticity window (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2004; HEIDEL *et al.*, 1999; PLAGEMANN *et al.*, 1992). In line, perinatal overfeeding rats due to reduced litter size become persistently overweight, insulin resistant, glucose intolerant, and have hypoactivity of the brown adipose tissue, and dysfunctions of the pancreatic beta cells and the autonomic nervous system (DE ALMEIDA *et al.*, 2013; MALTA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2021; RINALDI *et al.*, 2014) that converges to an obese and diabetic phenotype in adulthood. This metabolic disruption are commonly linked by the role of pro-inflammatory cytokines that induces insulin resistance associated to a chronic low-grade inflammation (SALTIEL; OLEFSKY, 2017).

The role of pro-inflammatory cytokines, likewise interleukin 6 (IL-6) (BOBBO *et al.*, 2019), interleukin 1 beta (IL-1 β) (DROR *et al.*, 2017) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (HOTAMISLIGIL *et al.*, 1993) are known by exert metabolic effects, most

notably being implicated in insulin resistance and obesity. It has been shown that overfeeding during early postnatal life repercuss in white adipose tissue inflammation (KAYSER *et al.*, 2015) as well as activation of the hypothalamic pro-inflammatory response in obese rats, induced by consumption of a high-fat diet (DE SOUZA *et al.*, 2005). These features of obesity-induced inflammation and/or inflammation-induced insulin resistance are yet a challenge to understanding the underlying mechanisms affecting metabolic systems by triggering metabolic syndrome.

To date, many efforts have been made in the quest to treat and/or prevent metabolic comorbidities. Among different of them, the use of bioactive molecules and functional foods as nutraceutical approach (ASGARY *et al.*, 2018; CICERO *et al.*, 2018; MATHIAS *et al.*, 2014) compound some of the evidences about benefits of the non-pharmacological interventions. In this field, using functional food such as calcium (CONCEICAO *et al.*, 2017), fish oil (DAI *et al.*, 2016) and soy isoflavones (RIBEIRO *et al.*, 2021) as nutraceutical intervention to prevent metabolic derangements in early overfeeding rats highlights the role of functional food on prevents long-term effects of early programming. In addition, plant extracts' compounds, such as phaseolamin, a substance present in white bean (*Phaseolus vulgaris* L.), have properties to control blood glucose levels. On this field, the role white bean and its derived on weight loss and glycemic control have been recently reported (BARRETT; UDANI, 2011; SHI *et al.*, 2020), although few is known about the mechanisms by which white bean can ameliorate metabolic syndrome.

Here we aimed to test the hypothesis that the obese phenotype and metabolic dysfunctions featured in the post-natal overfeeding rats is associated with central low-grade inflammation, and that it can be prevented by a white bean dietary supplementation offer.

Material and methods

Ethical Approval

All experimental protocol was approved by the Ethical Committee for the Animal Use and Experiments of the Federal University of Mato Grosso (CEUA/UFMT; process number 23108.089573/2020-23), which adheres to the Brazilian Federal Law number 11.794/2008. Our study complies with the animal ethics checklist as described by (GRUNDY, 2015).

Experimental animal-model

Wistar rats (n=24 females; bred with 2 females/male) were kept under controlled conditions of temperature ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity ($60\pm 5\%$) and a 12-hour light cycle (06:00 AM-06:00 PM), with water and food (Nuvilab®, Curitiba, PR, Brazil) *ad libitum* throughout pregnancy and lactation. Before mating, the weight of the females was monitored for 1 week, after which 2 females were placed together with one breeding male, leaving them for 2 weeks in mating, or until it was detected that the female was pregnant through weight gain.

After pregnancy, the females were separated from the males and kept in individual boxes during the entire gestation and lactation period, where their body weight, food and water intake were measured every two days until weaning of their respective offspring at 22 days of lactation.

At birth, all pups were weighed, and litters size was adjusted to 8 pups for each dam (preferentially male). To induce obesity by early overfeeding, a small litter animal model was used, as previously postulated (AUBERT *et al.*, 1980; CRYER; JONES, 1979; PLAGEMANN *et al.*, 1992). At post-natal day 3, the litter size was adjusted to three male pups per dam small litter, SL group) or to eight pups per dam that served as controls (normal litter; NL group).

At post-natal day 22, the pups from both experimental groups were weaned, and only male rats were retained for the study (n=56–64 rat offspring from each of eight different NL mothers and n=48 rat offspring from each of 16 different SL mothers). Thereafter, the half of rats in each NL and SL groups was fed, *ad libitum*, a standard diet (NL-SD group, n=28-32 rats from each of four different NL mothers and SL-SD, n=24 rats from each of eight different SL mothers) or a diet supplemented with 2.5% of White Bean Flour *Phaseolus vulgaris L.* (NL-WB group, n=28-32 rats from each of eight different

NL mothers and SL-WB, n=24 rats from each of four different NL mothers) until they were 100 days old, at which time the rats were analyzed.

Milk sample collection and biochemical analysis

On the day 12th of lactation, a batch of lactating dams (n=8 per group) were separated from their pups for 2 hours, before milk collection, aiming to accumulate milk in the mammary glands. The fed dams were anesthetized with ketamine-xylazine mixture (ketamine: 75mg + xylazine: 15mg/kg of body weight, i.m.) and received an injection of synthetic oxytocin (2.5 UI/kg of body weight, i.p.; Oxytocin[®], Chemical Union, Embu, São Paulo, Brazil) to induce milk secretion (DEPETERS; HOVEY, 2009; MIRANDA *et al.*, 2017). Milking was performed by manually massaging the nipple and using a graduated pipette 500µL of milk collected and placed into a sterile plastic microtube on an ice plate, after that milk sample was stored at -20 °C for subsequent biochemical analysis (MIRANDA *et al.*, 2017).

Milk glucose was measured by the enzymatic colorimetric glucose oxidase method, as well the total cholesterol, triglycerides and total proteins were measured with a commercial kit (Gold Analisa[®]; Belo Horizonte, MG, Brazil).

Milk energy content was quantified by the creatocrit technique, as previously reported (LUCAS *et al.*, 1978; XAVIER *et al.*, 2019) in a volume of 75µL of milk, in which the milk percentage of fat, as well as the milk energy (cal/L) were estimated.

Milk consumption during by rat offspring

Milk consumption, assessed at post-natal days 6, 11 and 16, was taken using a protocol adapted from the previous study (BAUTISTA *et al.*, 2019). The rats were separated from their mothers for 4 hours to fasting. Next, they were weighed and put back with mothers for suckling them per 1 hour, when they were immediately weighed. The difference between pre- and post-milk feeding weight, in each individually rat, was taken as the amount of milk intake by each one.

White bean flour-dietary preparation

The white bean was purchased from a supermarket located in the city of Sinop, MT. After that, the white bean was ground until a completely flour aspect. Subsequently, 2.5% of white bean flour was added to the standard rodent chow feed-bran and water was added as necessary to maintain the mixture wet enough to facilitate the pellet

formation. After that, to dry and to avoid loss of volatile compounds and chemical modifications, the pellets were taken to the oven with forced air circulation at 55 °C per 24 hours.

Diets composition measurement

The content of moisture, total proteins, total lipids, carbohydrates, total fibers and ash was determined in both diets (Table 1) by using the methods according to the Association of Official Analytical Chemists (AOAC), as recently reported (Kandyliari *et al.*, 2020), in which all this bromatological analysis was performed in the laboratory of Animal Science - UFMT/Sinop.

The moisture content was determined by drying diet samples in oven at 105°C, without air circulation until constant weight, according to the AOAC, as recently reported (CHACHA; LASWAI, 2020). Protein content was estimated by considering the total nitrogen content using the general conversion factor of 6.25. The total nitrogen in the sample was determined by the micro-Kjeldahl method, using copper and sodium sulfate as catalysts in the mineralization and boric acid as the ammonia receptor solution in the distillation, as recommended by American Association of Cereal Chemist (AACC).

Ashes were obtained by incineration in a muffle furnace at 550°C and total lipids were determined by continuous extraction using the Randall method with petroleum ether as solvent, approved by the American Oil Chemists' Society as an Official Procedure, (AOCS; method Am 5-04). The carbohydrate content was established by difference, considering the percentage of water, protein, total lipids, and ash. To the carbohydrate values are contained the total dietary fiber. The latter was determined by the enzymatic gravimetric method of AOAC and (PROSKY *et al.*, 1985). The calculation of the energy content of the diets was established according to the Atwater system.

Body weight growth and food and water intake

The body weight and food and water intake were measured every two days, from weaning (22 days old) until adulthood (100 days old). The food and water consumption were performed by consider the average intake of all animals in the cage, which was relativized by the mean of rat's body weight (g/100g of body weight). The area under the curve (AUC) of the entire observation period was calculated for the body weight, and food and water intake measurements, as previously reported (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Assessment of glucose-insulin homeostasis

To perform intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT), after food deprivation for 12 hours (7:00 AM–7:00 PM), with free access to water, a glucose load (2g/kg body weight) was injected intraperitoneally into the conscious rats. A blood sample was initially collected before the initial glucose load (0 min, basal glycemia) and at 30, 60, 90 and 120 minutes. All blood samples were obtained from the tail vein, and the glucose concentration was determined by a digital glucometer (Accu-Chek[®] Performa, Roche), as previously reported (MATHIAS *et al.*, 2020).

The intraperitoneal insulin tolerance test (ipITT) was performed in the same rats that underwent ipGTT. Thus, 24 hours after the ipGTT, rats (n=12 rats from 3 different litters) was fasted for 4 hours and then subjected to ipITT (1 IU/kg bw). Samples for blood glucose measurements were collected immediately before the insulin injection (0 min, basal) and at 15, 30, 45 and 60 min after insulin injection. Thereafter, the rate of glucose tissue uptake or the rate constant for plasma glucose disappearance (Kitt) was calculated by the formula $0.693/(t_{1/2})$. The plasma glucose half-life was calculated from the slope of the least-square analysis of the plasma glucose concentrations during the linear phase of decline (LUNDBAEK, 1962).

Assessment of intracerebroventricular (icv) insulin injection on food intake

To evaluate the central action of insulin on food intake, a batch of rats (n=8–10 for each group) was used. The animals' heads were fixed in the stereotaxic frame (Insight Instruments, Ribeirão Preto, SP, Brazil) for the implantation of a guide cannula into the right lateral ventricle, as previously described (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016). The guide cannula was directed to the right lateral ventricle, considering the Bregma as a reference, according to coordinates: anteroposterior, –0.80mm; mediolateral, –1.5mm and dorsoventral, –2.6mm, according to Paxinos and Watson (PAXINOS; KEITH B. J. FRANKLIN, 2007). After the surgery, each rat was kept into individual cages. A recovery time of 5 days was permitted after the surgical procedure.

The icv treatment and food intake measurement after the icv injection were performed in rats deprived of food for 6 hours (1:00 PM–7:00 PM) with free access to water. The icv injection of 2 μ L with saline (NaCl, 0.9%) or insulin (10^{-3} mmol/L) was performed at 7:00 PM, as previously published (DE OLIVEIRA *et al.*, 2016; ROPELLE *et al.*, 2009). Thereafter, standard chow was given, and food intake was determined by measuring the

difference between the weight of the chow given and the weight of chow at the end of the two different periods, at 4 hours (11:00 PM) and 12 hours (7:00 AM) after the icv injection. Food intake was relativized by the body weight of rat (g/100g of body weight).

Biometric parameters

At the end of the experimental procedure, overnight fasted 100 days old rat offspring (n=24, 4 rats from each of four different litters, for each group) were euthanized by decapitation (PIEROZAN *et al.*, 2017; VAN RIJN *et al.*, 2011). Immediately after euthanasia, the blood sample, hypothalamus, visceral white adipose tissue (periepididymal, retroperitoneal and mesenteric fat) and skeletal muscle (soleus muscle and the extensor digitorum longus, EDL) were removed.

Blood was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further biochemical analyses, hypothalamus was stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for further inflammatory markers analyses and visceral fat pad and skeletal muscle representative sample weighted to assess the body composition.

The adiposity index was used to assess the amount of body fat of the animals more accurately. For this, the sum of visceral fat deposits normalized by the rat body weight was used as follow calculation: adiposity index = [(periepididymal + retroperitoneal + mesenteric fat)/body weight x 100]. Likewise, the skeletal lean mass index was calculated as the sum of their values normalized by the rat body weight: lean mass index = [(soleus + EDL)/body weight x 100].

Biochemical parameters

After blood collection, in heparinized tubes, it was centrifuged for 10 minutes at 1,248 g, and plasma samples (n=8, 2 rats from each of 4 different litters, for each group) were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent glycemia, total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol and triglyceride evaluation using commercial kits (Gold Analisa[®], Belo Horizonte, MG, Brazil) through spectrophotometry.

Regarding peripheral glucose-insulin homeostasis, the index of the rate of fasting triglycerides and glycemia (the TyG index) was calculated to predict the body insulin sensitivity, since the TyG index is widely used by clinicians to identify insulin resistance in apparently healthy individuals: TyG index = $\text{Ln}[(\text{Fasting glycemia}_{(\text{mg/dL})}) \times (\text{Fasting triglycerides}_{(\text{mg/dL})})/2]$ (SIMENTAL-MENDIA *et al.*, 2008).

Hypothalamic cytokines measurement

The hypothalamic homogenate content of the pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α and anti-inflammatory cytokine IL-10 were quantified by commercial ELISA kits. The homogenate was obtained by adding 300 μ L of PBS to the tissue followed by homogenization (twice, 10 second pulses using an Ultra-turrax[®] disperser (IKA[®] T10 basic, Germany). Subsequently, the homogenate was centrifuged at 3,669 g and the supernatant collected.

Determination of cytokines was performed following the manufacturer instructions, IL-1 β (catalog number DY501-05; R&D System, Minneapolis, MN, USA), IL-6 (catalog number DY506-05; R&D System, Minneapolis, MN, USA), IL-10 (catalog number DY522-05; R&D System, Minneapolis, MN, USA) and TNF- α (catalog number 438204; BioLegend's ELISA MAX[™] Deluxe Sets, San Diego, CA, USA). The technique used in the assays was the sandwich ELISA, employing monoclonal antibodies to detect the cytokines in the concentrations recommended by the manufacturers.

Statistical analyses

Data were analyzed using the appropriate statistical program GraphPad Prism, version 8 for Windows (GraphPad Prism[®] Software, San Diego, CA, USA) and the values expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM), which were submitted to the D'agostino-Pearson or Shapiro-Wilk normality test. The statistical analysis between the means of two groups was performed using unpaired Student's t-test, when it assumed a normal Gaussian distribution. One-way analysis of variance (one-way ANOVA) or Kruskal-Wallis's test were used to determine differences among groups, followed by Bonferroni post-hoc comparisons to identify specific differences in means between groups when it assumed a normal Gaussian distribution. The significance level considered for all variables was 95%.

Results

Effect of litter size reduction on the milk composition

Even though total protein milk concentration was not statistical different between groups ($P>0.05$), high levels of glucose (41.02%, $P<0.05$), total cholesterol (16.66%, $P<0.05$), triglycerides (14.24%, $P<0.05$), total fat (48.88%, $P<0.05$) and total energy (42.87%, $P<0.05$) were observed in the milk from SL mothers than NL mothers (Table 2).

Effect of litter size reduction on the body weight gain and milk intake at suckling phase

As expected, there were no statistical difference in birthweight of rat-offspring (NL: 6.26 ± 0.05 , $n=40$, versus SL: 6.12 ± 0.06 , $n=40$, $P=0.126$). However, during suckling period the body weight gain in SL rats was 16.64% higher than in NL rats ($P<0.001$, Figure 1A). At 6th day of age, SL rats fed more milk than NL rats (18.89%, $P<0.01$, Figure 1B), as well as, at 11th (13.16%, $P<0,05$, Figure 1B). Interestingly, at the age 16th it was smaller in SL rats than in NL rats, even though not statistically different (9.54%, $P>0.05$, Figure 1B).

Effect of white bean dietary supplementation on the body weight gain, food intake and biometrical parameters

As showed in the area under the curve (AUC) from body weight gain, from weaning until adulthood, SL-SD were 7.78% heavier that NL-SD ($P<0.05$, Figure 2A–B), while the body weight gain in NL-WB rats were 4.59% smaller than their counterparts ($P<0.01$, Figure 2A–B), it was not statistical different between SL-SD and SL-WB rats ($P>0.05$, Figure 2A–B).

In addition, SL-SD rats were hyperphagic when compared to NL-SD rats (10.99%, $P<0.001$, Figure 2C–D), while the food intake of SL-WB was not statistical different when compared to their counterparts ($P>0.05$, Figure 2C–D) in control rats, it was reduced by 4.65% in NL-WB rats when compared to NL-SD ($P<0.05$, Figure 2C–D). Regarding the water consumption, there was no statistical difference between groups throughout the experimental period ($P>0.05$, data not showed).

The Table 3 shows the body composition from rats at 100-day-old. The SL-SD rats were phenotypically obese, presenting higher body weight (20.93%, $P<0.001$) and adiposity index (48.28%, $P<0.001$), without changes in the lean mass index ($P<0.05$) when compared with NL-SD rats. In turn, even SL-WB rats present a reduction of

13.91% in the body weight, when compared to SL-SD group, ($P<0.05$). On the other hand, the adiposity index of SL-WB rats was 25.12% smaller than SL-SD rats ($P<0.001$).

The body weight and adiposity index of NL-WB rats did not differ from NL-SD rats, as well as there were no statistical differences among the groups, in regarding lean mass index ($P>0.05$, Table 3).

Effect of white bean dietary supplementation on the lipid profile and glucose homeostasis

Regarding biochemical parameters, the levels of glycemia (17.92%, $P<0.001$), triglyceridemia (48.40%, $P<0.05$), total-cholesterolemia (25.52%, $P<0.01$) and VLDL-cholesterol (80.35%, $P<0.001$) were higher in SL-SD than NL-SD rats (Figure 3). In addition, the values of TyG index were 9.34% higher in SL-SD than NL-SD rats ($P<0.001$, Figure 3).

Assessing the role of white bean dietary supplementation, the SL-WB rats displayed reduction in the levels of glycemia (14.51%, $P<0.01$) and total-cholesterolemia (24.23%, $P<0.05$), and, even did not statistically different, SL-WB rats displayed reduction in the triglyceridemia (13.91%, $P>0.05$), VLDL-cholesterol (16.24%, $P>0.05$) and in the TyG index (5,19%, $P>0.05$), when compared to SL-SD rats (Figure 3).

Comparing the groups NL-WB with NL-SD, they did not differ in regarding all biochemical-assessed parameters.

Regarding the HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and total-proteins, it did not differ amongst the groups ($P>0.05$, data not showed)

Effect of white bean dietary supplementation on the peripheral glucose tolerance

In comparison to NL-SD group, by displaying an increase in the glucose curve increment at points 30 and 120 minutes ($P<0.05$, Figure 4A), as well as an increase of 26.12% in the area under the curve of the ipGTT glucose increment, SL-SD rats were glucose intolerant ($P<0.05$, Figure 4B). While there was no statistical difference among the NL-SD, NL-WB and SL-WB groups ($P>0.05$, Figure 4A–B), a reduction of 26.63% in the area under the curve of increment of glycemia from SL-WB rats compared to SL-SD rats was observed during the ipGTT ($P<0.01$, Figure 4B).

Regarding the ipITT, when compared to NL-SD group, the SL-SD rats displayed the Kitt value reduced by 56.56% ($P < 0.001$, Figure 4D). In turn, the Kitt value of the SL-WB rats was 135.15% higher than the SL-SD rats ($P < 0.001$, Figure 4D). There were no statistical differences among the NL-WB, SL-WB and NL-SD groups ($P > 0.05$, Figure 4C–D).

Effect of intracerebroventricular insulin injection on food intake

Figure 5 depicts data about assessment of food intake at the first 4 hours and overnight. At the first four hours, compared to NL-SD rats, SL-SD were hyperphagic (17.29%, $P < 0.05$). On the other hand, SL-WB rats presented reduction of 18.60% in food intake when compared to SL-SD rats ($P < 0.01$), while there was no statistical difference between NL-WB *versus* NL-SD rat's food intake ($P > 0.05$).

During the first four hours under the central insulin injection, insulin was able on reduce food intake by 30.18% in NL-SD and by 47.73% in NL-WB rat ($P < 0.001$), as well as by 31.89% in SL-WB ($P < 0.01$) but did not in SL-SD rats compared to their counterparts ($P > 0.05$).

The overnight assessment of food intake shows that SL-SD fed 21.33% more than NL-SD rats ($P < 0.05$, Figure 5). On the other hand there was no statistical difference between the food intake of the SL-WB *versus* SL-SD and NL-WB *versus* that of the NL-SD rat ($P > 0.05$).

Regarding overnight food intake assessment, there was no statistical difference among the groups under the central insulin injection ($P < 0.05$).

Effect of white bean-dietary supplementation on the hypothalamic inflammatory cytokines

As showed in the Figure 6, high levels of hypothalamic pro inflammatory cytokines were found in SL-SD rats. Compared to NL-SD group, while the hypothalamic levels of IL-10 did not differ between NL-SD and SL-SD rats ($P > 0.05$), the levels of IL-6 increased by 85.61% ($P < 0.001$), the levels of IL-1 β increased by 43.21% ($P < 0.01$) and the levels of TNF- α increased by 47.52% ($P < 0.01$). On the other hand, compared to SL-SD group, all these pro inflammatory markers reduced in SL-WB rats. Where the levels of IL-6 reduced by 26.49% ($P < 0.05$), the levels of IL-1 β decreased by 33.07% ($P < 0.01$) and the levels of TNF- α increased by 30.27% ($P < 0.05$). No statistical difference was found amongst the NL-SD, NL-WB and SL-WB groups ($P > 0.05$).

Discussion

The early overfeeding rat-model have been well characterized over the years by display an obese and type 2 diabetic phenotype. Regarding this, hyperphagia and increased visceral fat accumulation, as well as peripheral insulin resistance, glucose intolerance and pancreatic β -cell impairment are some of main reported metabolic dysfunctions (FROLKIS *et al.*, 1993; PLAGEMANN *et al.*, 1992; RIBEIRO *et al.*, 2017) that are triggered in early stage of development. In the present study, we highlight the beneficial effect of functional diet, white bean-dietary supplementation, on the health status of the rats overfed during suckling phase.

Herein, we show that milk from mothers nursing rats grow upping in small litter contains high-energy content, especially by contain elevated levels of fat, such as cholesterol and triglycerides, as well as an elevated glycemic level. It corroborates previous study where mother nursing small litter rats display milk enriched in cholesterol and triglycerides, even did not differing in glucose and total content of proteins (XAVIER *et al.*, 2019). In this regard, whether translated for human condition where milk triglycerides contribute with around 50% of the milk energy (JENSEN, 1996; NOMMSEN *et al.*, 1991), it must be a strong predictor of early onset of obesity. In fact, the hyperphagic behavior observed herein in the small litter rats, in early stages of suckling period, together with the higher caloric milk composition, are suggestive to be one of pivotal factor contributing to early output of metabolic dysfunction in this early overfeeding rat-model. Besides, alteration in hypothalamic neuronal circuitry (PLAGEMANN *et al.*, 2009) is another important point to be considered, as well as changes in milk hormones involved in metabolic regulation (BADILLO-SUAREZ *et al.*, 2017), early hyperinsulinemia in suckling phase (MALTA *et al.*, 2016), and maternal pancreatic failure, which affects offspring supply of milk insulin (CAPRIGLIONI CANCIAN *et al.*, 2016; XAVIER *et al.*, 2019) cannot be discarded as other factors underlying the early programming of metabolic derangements in this early overfeeding rats.

For our knowledge, we are showing by the first time that white bean, as dietary supplementation, blocks the onset of metabolic dysfunction in early overfeeding rats, which seems to be associated with amelioration in the hypothalamic inflammation. As previously reported the anti-hyperglycemic and hypolipidemic effects of white bean were useful on improve metabolic derangements in high-fat diet-induced obese rats (SHI *et al.*, 2020). In line, the regular ingestion of whit kidney bean by male and female

mice leads to obesity parameters amelioration, which has been shown to be associated with reduced ratio of firmicutes to bacteroidetes phylum (NEIL *et al.*, 2019). In this regard, as recently reported small litter rats, in both sex, display dysbiosis, where an increased firmicutes and decreased bacteroidetes have been reported (RODRIGUES *et al.*, 2022). Even we did study the brain-gut axis, we did not discard that the white bean diet must be modulating this axis in this rat model, which deserves attention and is an interesting issue to be farther studied (WANG, S. *et al.*, 2021).

Herein, the early overfeeding rats that did not feed white bean-dietary supplementation were obese, dyslipidemic, hyperglycemic, glucose intolerant and insulin resistant, as already demonstrated (DE ALMEIDA *et al.*, 2013; MALTA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2017), while their counterparts that were fed an white bean-dietary supplementation throughout life did not present those metabolic dysfunctions.

Regarding the efficacy of dietary supplementation with white beans, our data show that there was a beneficial effect of white bean supplementation in preventing greater body weight gain in SL animals that ingested this diet, which showed less accumulation of adiposity, and at the same time showed an adiposity index similar to that of the NL-SD group.

This is probably due to the action of phaseolamine decreasing the activity of α -amylase, since this action is already well reported in some clinical and experimental studies (BARRETT; UDANI, 2011; HANGEN; BENNINK, 2002). Since α -amylase is responsible for breaking down the carbohydrates present in food, the phaseolamine present in beans may be contributing to a lower absorption of glucose and consequently reducing visceral fat stores in our model. As already reported in the literature, the longer the rats are exposed to the action of phaseolamine, the less they eat the food (HARIKUMAR *et al.*, 2005).

Even though we did not assess pancreatic islet function, in relation to insulin secretion, nor measured insulin plasma levels, which represents a limitation in our study, it is important to keep in mind that this obese rat-model, induced by early overnutrition, exhibits endocrine pancreatic islet impairment (MALTA *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2021; RIBEIRO *et al.*, 2017), as well as is hyperinsulinemic, which corroborates their diabetic phenotype. Furthermore, we suggest that the improvement observed here in glucose homeostasis, including glucose tolerance and peripheral insulin sensitivity predicted by the higher rate of glucose uptake, observed in Kitt, and predicted by the TyG index, may be directly associated with the effect of white bean components on

improving pancreatic beta cell function. Similarly, it must be considered that the role of white bean supplementation improves systemic metabolic homeostasis (BARRETT; UDANI, 2011; WANG, S. *et al.*, 2021).

As known, seminal studies in literature report about the hyperphagia as one of the important markers in overfeeding-induced obese rats. Likewise, our data show that SL-SD rats are hyperphagic, and usefully white bean-dietary supplementation prevents hyperphagia in rats exposed to early postnatal overfeeding. Deregulation in mechanisms involved in hypothalamic circuitry controlling feeding behavior, in this rat-model; have been elegantly reported by the Davidowa-Plagemann's research group. Where rats rearing in small litter display hypothalamic neuronal circuitry alterations, such as high responsivity in ventromedial NPY neurons (HEIDEL *et al.*, 1999), reduced leptin (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2000) and insulin (DAVIDOWA; PLAGEMANN, 2007) inhibition in the arcuate neurons. In addition, increased hypothalamic expression of glucagon like-peptide 1 (GLP-1) receptor and decreased hypothalamic expression of cholecystinin (CCK) receptor have been reported to be present in early overfeeding male and female rats, respectively (RODRIGUES *et al.*, 2022), which are convincing events that converges to a high food intake behavior and obesity development, as we show in the present study. Indeed, our data show that SL-SD rats were not responsive to the intracerebroventricular injection of insulin, emphasizing that these early overfeeding rats are centrally resistant to action of insulin.

Benefits of white bean on metabolic health, improving the status of glucose homeostasis and dyslipidemia in both human and rodents have been showed (BARRETT; UDANI, 2011; WANG, A. *et al.*, 2021). Although, for our knowledge, there is no data about the effect of white bean or its compounds in the brain. Herein, we show that the central insulin resistance observed in SL-SD rats was not found in SL-WB rats; as well as the inflammatory markers (high TNF- α , IL-6 and IL-1 β) observed in the hypothalamus of SL-SD rats were not present in SL-WB rats. It implies that the effect of white bean-dietary supplementation on preventing hyperphagia in these early overfeeding rats are associated with the improvement of central insulin sensitivity that can be due to the block of inflammation, which allows us to suggest that removing the hypothalamic inflammatory cytokines, it facilitates neuronal circuitry to be adequately sensitized by the action of insulin (BOBBO *et al.*, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2005; MILANSKI *et al.*, 2012). Besides, even we did not assess the leptin action in the present study, central leptin resistance that has also been reported in this rat-model (GLAVAS *et al.*, 2010)

can be affected positively by the effect of white bean on ameliorating the health status in early overfeeding rats. In fact, regulations of brain insulin and leptin signaling converges through the insulin receptor substrate and phosphatidil inositol 3 kinase (IRS/PI3K) cascade that recruits suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) (KLEINRIDDERS *et al.*, 2014; KONNER; BRUNING, 2012). In this regards, hypothalamic risen of the proinflammatory cytokines, such as TNF- α , IL-6 and IL-1 as found in the present study have been showed by induce central insulin resistance in high-fat-induced obese rats (DE SOUZA *et al.*, 2005), as well obese-induced by high-fat diet leads to central insulin resistance directly associated with IR/PI3K-dependent inhibition (KLOCKENER *et al.*, 2011).

In conclusion, our data show that obese rats induced by early overfeeding display hypothalamic low-grade inflammation and insulin resistance, likewise it happens in obese-induced by high-fat diet. In addition, we show that the use of white bean-dietary supplementation as nutraceutical intervention is able on preventing metabolic derangement such as glucose intolerance, hypothalamic inflammation and obese hyperphagia and central insulin resistance.

Funding

This work was funded by any Brazilian Federal Research Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Master student fellowship, 8887.675544/2022-00).

Author contributions

EVA and JCO designed the study; EVA, and JCO revised the manuscript; EVA, TVA, LSBJ, MVFR, CLSR, IRBS, BVTC, STM, GFB and RO conducted the research; EVA and JCO analyzed the data; JCO and EVA wrote the manuscript; JCO acted as the principal investigator, provided support, and reviewed the data and manuscript.

Competing interest

The authors declare that there no conflict of interest.

References

ASGARY, S.; RASTQAR, A.; KESHVARI, M. Functional Food and Cardiovascular Disease Prevention and Treatment: A Review. **J Am Coll Nutr**, 37, n. 5, p. 429-455, Jul 2018.

AUBERT, R.; SUQUET, J. P.; LEMONNIER, D. Long-term morphological and metabolic effects of early under- and over-nutrition in mice. **J Nutr**, 110, n. 4, p. 649-661, Apr 1980.

BADILLO-SUAREZ, P. A.; RODRIGUEZ-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**, 22, n. 3, p. 171-191, Sep 2017.

BARRETT, M. L.; UDANI, J. K. A proprietary alpha-amylase inhibitor from white bean (*Phaseolus vulgaris*): a review of clinical studies on weight loss and glycemic control. **Nutr J**, 10, p. 24, Mar 17 2011.

BAUTISTA, C. J.; BAUTISTA, R. J.; MONTANO, S.; REYES-CASTRO, L. A.; RODRIGUEZ-PENA, O. N. *et al.* Effects of maternal protein restriction during pregnancy and lactation on milk composition and offspring development. **Br J Nutr**, p. 1-11, Jul 26 2019.

BOBBO, V. C. D.; JARA, C. P.; MENDES, N. F.; MORARI, J.; VELLOSO, L. A. *et al.* Interleukin-6 Expression by Hypothalamic Microglia in Multiple Inflammatory Contexts: A Systematic Review. **Biomed Res Int**, 2019, p. 1365210, 2019.

CAPRIGLIONI CANCIAN, C. R.; LEITE, N. C.; MONTES, E. G.; FISHER, S. V.; WASELCOSKI, L. *et al.* Histological and Metabolic State of Dams Suckling Small Litter or MSG-Treated Pups. **ScientificWorldJournal**, 2016, p. 1678541, 2016.

CHACHA, J. S.; LASWAI, H. S. Micronutrients Potential of Underutilized Vegetables and Their Role in Fighting Hidden Hunger. **Int J Food Sci**, 2020, p. 9408315, 2020.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, 92, p. 6-10, Mar 2019.

CICERO, A. F. G.; COLLETTI, A.; BELLENTANI, S. Nutraceutical Approach to Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD): The Available Clinical Evidence. **Nutrients**, 10, n. 9, Aug 23 2018.

CONCEICAO, E. P. S.; MOURA, E. G.; OLIVEIRA, E.; GUARDA, D. S.; FIGUEIREDO, M. S. *et al.* Dietary calcium supplementation in adult rats reverts brown adipose tissue dysfunction programmed by postnatal early overfeeding. **J Nutr Biochem**, 39, p. 117-125, Jan 2017.

CRYER, A.; JONES, H. M. The early development of white adipose tissue. Effects of litter size on the lipoprotein lipase activity of four adipose-tissue depots, serum immunoreactive insulin and tissue cellularity during the first four weeks of life in the rat. **Biochem J**, 178, n. 3, p. 711-724, Mar 15 1979.

DAI, Y.; YANG, F.; ZHOU, N.; SHA, L.; ZHOU, S. *et al.* A post-weaning fish oil dietary intervention reverses adverse metabolic outcomes and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 expression in postnatal overfed rats. **Br J Nutr**, 116, n. 9, p. 1519-1529, Nov 2016.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Decreased inhibition by leptin of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed young rats. **Neuroreport**, 11, n. 12, p. 2795-2798, Aug 21 2000.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Hypothalamic neurons of postnatally overfed, overweight rats respond differentially to corticotropin-releasing hormones. **Neurosci Lett**, 371, n. 1, p. 64-68, Nov 16 2004.

DAVIDOWA, H.; PLAGEMANN, A. Insulin resistance of hypothalamic arcuate neurons in neonatally overfed rats. **Neuroreport**, 18, n. 5, p. 521-524, Mar 26 2007.

DE ALMEIDA, D. L.; FABRICIO, G. S.; TROMBINI, A. B.; PAVANELLO, A.; TOFOLO, L. P. *et al.* Early overfeed-induced obesity leads to brown adipose tissue hypoactivity in rats. **Cell Physiol Biochem**, 32, n. 6, p. 1621-1630, 2013.

DE OLIVEIRA, J. C.; GOMES, R. M.; MIRANDA, R. A.; BARELLA, L. F.; MALTA, A. *et al.* Protein Restriction During the Last Third of Pregnancy Malprograms the Neuroendocrine Axes to Induce Metabolic Syndrome in Adult Male Rat Offspring. **Endocrinology**, 157, n. 5, p. 1799-1812, May 2016.

DE SOUZA, C. T.; ARAUJO, E. P.; BORDIN, S.; ASHIMINE, R.; ZOLLNER, R. L. *et al.* Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. **Endocrinology**, 146, n. 10, p. 4192-4199, Oct 2005.

DEPETERS, E. J.; HOVEY, R. C. Methods for collecting milk from mice. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 14, n. 4, p. 397-400, Dec 2009.

DROR, E.; DALMAS, E.; MEIER, D. T.; WUEEST, S.; THEVENET, J. *et al.* Postprandial macrophage-derived IL-1beta stimulates insulin, and both synergistically promote glucose disposal and inflammation. **Nat Immunol**, 18, n. 3, p. 283-292, Mar 2017.

FACCHI, J. C.; LIMA, T. A. L.; OLIVEIRA, L. R.; COSTERMANI, H. O.; MIRANDA, G. D. S. *et al.* Perinatal programming of metabolic diseases: The role of glucocorticoids. **Metabolism**, 104, p. 154047, Mar 2020.

FROLKIS, V. V.; GRIGOROV, Y. G.; PISARCHUK, K. L. Long-term effects of litter size in early postnatal period on metabolism, aging and life span in rats. **Arch Gerontol Geriatr**, 17, n. 1, p. 65-73, Jul-Aug 1993.

GLAVAS, M. M.; KIRIGITI, M. A.; XIAO, X. Q.; ENRIORI, P. J.; FISHER, S. K. *et al.* Early overnutrition results in early-onset arcuate leptin resistance and increased sensitivity to high-fat diet. **Endocrinology**, 151, n. 4, p. 1598-1610, Apr 2010.

GRUNDY, D. Principles and standards for reporting animal experiments in The Journal of Physiology and Experimental Physiology. **J Physiol**, 593, n. 12, p. 2547-2549, Jun 15 2015.

HANGEN, L.; BENNINK, M. R. Consumption of black beans and navy beans (*Phaseolus vulgaris*) reduced azoxymethane-induced colon cancer in rats. **Nutr Cancer**, 44, n. 1, p. 60-65, 2002.

HARIKUMAR, K. B.; JESIL, A. M.; SABU, M. C.; KUTTAN, R. A preliminary assessment of the acute and subchronic toxicity profile of phase2: an alpha-amylase inhibitor. **Int J Toxicol**, 24, n. 2, p. 95-102, Mar-Apr 2005.

HASEBE, K.; KENDIG, M. D.; MORRIS, M. J. Mechanisms Underlying the Cognitive and Behavioural Effects of Maternal Obesity. **Nutrients**, 13, n. 1, Jan 15 2021.

HEIDEL, E.; PLAGEMANN, A.; DAVIDOWA, H. Increased response to NPY of hypothalamic VMN neurons in postnatally overfed juvenile rats. **Neuroreport**, 10, n. 9, p. 1827-1831, Jun 23 1999.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259, n. 5091, p. 87-91, Jan 1 1993.

JENSEN, R. G. The lipids in human milk. **Prog Lipid Res**, 35, n. 1, p. 53-92, Mar 1996.

KAYSER, B. D.; GORAN, M. I.; BOURET, S. G. Perinatal overnutrition exacerbates adipose tissue inflammation caused by high-fat feeding in C57BL/6J mice. **PLoS One**, 10, n. 3, p. e0121954, 2015.

KLEINRIDDERS, A.; FERRIS, H. A.; CAI, W.; KAHN, C. R. Insulin action in brain regulates systemic metabolism and brain function. **Diabetes**, 63, n. 7, p. 2232-2243, Jul 2014.

KLOCKENER, T.; HESS, S.; BELGARDT, B. F.; PAEGER, L.; VERHAGEN, L. A. *et al.* High-fat feeding promotes obesity via insulin receptor/PI3K-dependent inhibition of SF-1 VMH neurons. **Nat Neurosci**, 14, n. 7, p. 911-918, Jun 5 2011.

KONNER, A. C.; BRUNING, J. C. Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. **Cell Metab**, 16, n. 2, p. 144-152, Aug 8 2012.

LUCAS, A.; GIBBS, J. A.; LYSTER, R. L.; BAUM, J. D. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. **Br Med J**, 1, n. 6119, p. 1018-1020, Apr 22 1978.

LUNDBAEK, K. Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. **Br Med J**, 1, n. 5291, p. 1507-1513, Jun 2 1962.

MALTA, A.; SOUZA, A. A.; RIBEIRO, T. A.; FRANCISCO, F. A.; PAVANELLO, A. *et al.* Neonatal treatment with scopolamine butylbromide prevents metabolic dysfunction in male rats. **Sci Rep**, 6, p. 30745, 2016.

MATHIAS, P. C.; ELMHIRI, G.; DE OLIVEIRA, J. C.; DELAYRE-ORTHEZ, C.; BARELLA, L. F. *et al.* Maternal diet, bioactive molecules, and exercising as reprogramming tools of metabolic programming. **Eur J Nutr**, 53, n. 3, p. 711-722, Apr 2014.

MATHIAS, P. C. F.; MIRANDA, G. D. S.; BARELLA, L. F.; MIRANDA, R. A.; PAVANELLO, A. *et al.* Cholinergic-pathway-weakness-associated pancreatic islet dysfunction: a low-protein-diet imprint effect on weaned rat offspring. **J Dev Orig Health Dis**, 11, n. 5, p. 484-491, Oct 2020.

MILANSKI, M.; ARRUDA, A. P.; COOPE, A.; IGNACIO-SOUZA, L. M.; NUNEZ, C. E. *et al.* Inhibition of hypothalamic inflammation reverses diet-induced insulin resistance in the liver. **Diabetes**, 61, n. 6, p. 1455-1462, Jun 2012.

MIRANDA, R. A.; DA SILVA FRANCO, C. C.; DE OLIVEIRA, J. C.; BARELLA, L. F.; TOFOLO, L. P. *et al.* Cross-fostering reduces obesity induced by early exposure to monosodium glutamate in male rats. **Endocrine**, 55, n. 1, p. 101-112, Jan 2017.

NEIL, E. S.; MCGINLEY, J. N.; FITZGERALD, V. K.; LAUCK, C. A.; TABKE, J. A. *et al.* White Kidney Bean (*Phaseolus Vulgaris* L.) Consumption Reduces Fat Accumulation in a Polygenic Mouse Model of Obesity. **Nutrients**, 11, n. 11, Nov 15 2019.

NOMMSEN, L. A.; LOVELADY, C. A.; HEINIG, M. J.; LONNERDAL, B.; DEWEY, K. G. Determinants of energy, protein, lipid, and lactose concentrations in human milk during the first 12 mo of lactation: the DARLING Study. **Am J Clin Nutr**, 53, n. 2, p. 457-465, Feb 1991.

PALOU, M.; PICO, C.; PALOU, A. Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity. **Nutr Rev**, 76, n. 12, p. 875-892, Dec 1 2018.

PAXINOS, G.; KEITH B. J. FRANKLIN, M. **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates**. Elsevier Science, 2007. 9780123694607.

PICO, C.; REIS, F.; EGAS, C.; MATHIAS, P.; MATAFOME, P. Lactation as a programming window for metabolic syndrome. **Eur J Clin Invest**, p. e13482, Dec 22 2020.

PIEROZAN, P.; JERNEREN, F.; RANSOME, Y.; KARLSSON, O. The Choice of Euthanasia Method Affects Metabolic Serum Biomarkers. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 121, n. 2, p. 113-118, Aug 2017.

PLAGEMANN, A.; HARDER, T.; BRUNN, M.; HARDER, A.; ROEPKE, K. *et al.* Hypothalamic proopiomelanocortin promoter methylation becomes altered by early overfeeding: an epigenetic model of obesity and the metabolic syndrome. **J Physiol**, 587, n. Pt 20, p. 4963-4976, Oct 15 2009.

PLAGEMANN, A.; HEIDRICH, I.; GOTZ, F.; ROHDE, W.; DORNER, G. Obesity and enhanced diabetes and cardiovascular risk in adult rats due to early postnatal overfeeding. **Exp Clin Endocrinol**, 99, n. 3, p. 154-158, 1992.

PROSKY, L.; ASP, N. G.; FURDA, I.; DEVRIES, J. W.; SCHWEIZER, T. F. *et al.* Determination of total dietary fiber in foods and food products: collaborative study. **J Assoc Off Anal Chem**, 68, n. 4, p. 677-679, Jul-Aug 1985.

RIBEIRO, T. A.; PAVANELLO, A.; TOFOLO, L. P.; DE OLIVEIRA, J. C.; MORAES, A. M. P. *et al.* Soy isoflavones recover pancreatic islet function and prevent metabolic dysfunction in male rats. **J Endocrinol**, 250, n. 3, p. 81-91, Jul 7 2021.

RIBEIRO, T. A.; TOFOLO, L. P.; MARTINS, I. P.; PAVANELLO, A.; DE OLIVEIRA, J. C. *et al.* Maternal low intensity physical exercise prevents obesity in offspring rats exposed to early overnutrition. **Sci Rep**, 7, n. 1, p. 7634, Aug 9 2017.

RINALDI, W.; GOMES, R. M.; SCOMPARIN, D. X.; GRASSIOLLI, S.; RIBEIRO, T. A. *et al.* Low-intensity and moderate exercise training improves autonomic nervous system activity imbalanced by postnatal early overfeeding in rats. **J Int Soc Sports Nutr**, 11, p. 25, 2014.

RODRIGUES, V. S. T.; MOURA, E. G.; PEIXOTO, T. C.; SOARES, P. N.; LOPES, B. P. *et al.* The model of litter size reduction induces long-term disruption of the gut-brain axis: An explanation for the hyperphagia of Wistar rats of both sexes. **Physiol Rep**, 10, n. 3, p. e15191, Feb 2022.

ROPELLE, E. R.; PAULI, J. R.; PRADA, P.; CINTRA, D. E.; ROCHA, G. Z. *et al.* Inhibition of hypothalamic Foxo1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. **J Physiol**, 587, n. Pt 10, p. 2341-2351, May 15 2009.

SALTIEL, A. R.; OLEFSKY, J. M. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. **J Clin Invest**, 127, n. 1, p. 1-4, Jan 3 2017.

SHI, Z.; ZHU, Y.; TENG, C.; YAO, Y.; REN, G. *et al.* Anti-obesity effects of alpha-amylase inhibitor enriched-extract from white common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) associated with the modulation of gut microbiota composition in high-fat diet-induced obese rats. **Food Funct**, 11, n. 2, p. 1624-1634, Feb 26 2020.

SIMENTAL-MENDIA, L. E.; RODRIGUEZ-MORAN, M.; GUERRERO-ROMERO, F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. **Metab Syndr Relat Disord**, 6, n. 4, p. 299-304, Dec 2008.

VAN RIJN, C. M.; KRIJNEN, H.; MENTING-HERMELING, S.; COENEN, A. M. Decapitation in rats: latency to unconsciousness and the 'wave of death'. **PLoS One**, 6, n. 1, p. e16514, Jan 27 2011.

WANG, A.; MANTHIRAM, K.; DEDEOGLU, F.; LICAMELI, G. R. Periodic fever, aphthous stomatitis, pharyngitis, and adenitis (PFAPA) syndrome: A review. **World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg**, 7, n. 3, p. 166-173, Jul 2021.

WANG, S.; GUO, C.; XING, Z.; LI, M.; YANG, H. *et al.* Dietary Intervention With alpha-Amylase Inhibitor in White Kidney Beans Added Yogurt Modulated Gut Microbiota to Adjust Blood Glucose in Mice. **Front Nutr**, 8, p. 664976, 2021.

WHO. **World Health Organization. Obesity and overweight.** 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: 15 Jun 2021.

XAVIER, J. L. P.; SCOMPARIN, D. X.; PONTES, C. C.; RIBEIRO, P. R.; CORDEIRO, M. M. *et al.* Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. **An Acad Bras Cienc**, 91, n. 1, p. e20170971, Mar 21 2019.

Tables

Table 1. Bromatologic composition in standard rodent chow (Nuvilab[®]) and standard rodent chow added with 2.5% of white bean (*Phaseolus vulgaris*) diets.

The values are given in g per kg of diet.

Nutrients	Standard diet (SD) (g/kg)	White bean-supplemented diet (2.5% of white bean, WB) (g/kg)
Moisture	46.80	52.50
Ash	72.83	78.50
Crude protein	225.62	251.40
Ethereal extract	51.95	44.82
Dietary fiber	144.31	152.80
Carbohydrate	458.49	472.50
Energy value (kcal/kg) ¹	3.203,99	3.903,60

¹Food energy is expressed in kilocalories per kilogram of mass weight.

Table 2. Milk composition at 12th day of lactation.

Parameters	NL	SL
Glucose (mg/dL)	304.70 ± 13.09	429.70 ± 49.59 *
Total protein (g/dL)	863.70 ± 46.00	1019.00 ± 88.10
Total cholesterol (mg/dL)	254.60 ± 9.70	304.50 ± 10.92 *
Triglycerides (mg/dL)	1,271.00 ± 61.19	1,452.00 ± 45.73 *
Total fat content (%)	5.30 ± 0.68	7.80 ± 0.66 *
Total energy content (kcal/L)	764,30 ± 60.12	1,092.00 ± 117.30 *

Data are presented as mean ± SEM of 8 sample obtained from 8 mothers for each experimental group, which were analyzed by Student's t-test. * $P < 0.05$. NL, normal litter; SL, small litter.

Table 3. Effect of white bean-dietary supplementation on biometric parameters of adult rat offspring

Biometric parameters	NL-SD	NL-WB	SL-SD	SL-WB
Body weight (g)	364.4 ± 6.14	351.4 ± 4.08 ^{cd}	440.7 ± 2.01 ^{ab}	379.4 ± 5.93 ^c
Adiposity index (g/100g bw)	4.35 ± 0.54	4.22 ± 0.14 ^c	6.45 ± 0.37 ^{abd}	4.83 ± 0.20 ^c
Lean mass index (g/100g bw)	0.098 ± 0.002	0.104 ± 0.003	0.101 ± 0.010	0.107 ± 0.005

Data are presented as the mean ± SEM from 24 rats obtained from at least 4 or 8 different litters per experimental group from 6 different litters, which were submitted to statistical analysis by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-test test. Letters superscribed on the values represent statistical difference among groups. a) NL-SD, normal litter fed a standard diet; b) NL-WB, normal litter fed a white bean-supplemented diet; c) SL-SD, small litter fed a standard diet and d) SL-WB, small litter fed a white bean-supplemented diet.

Figure 1

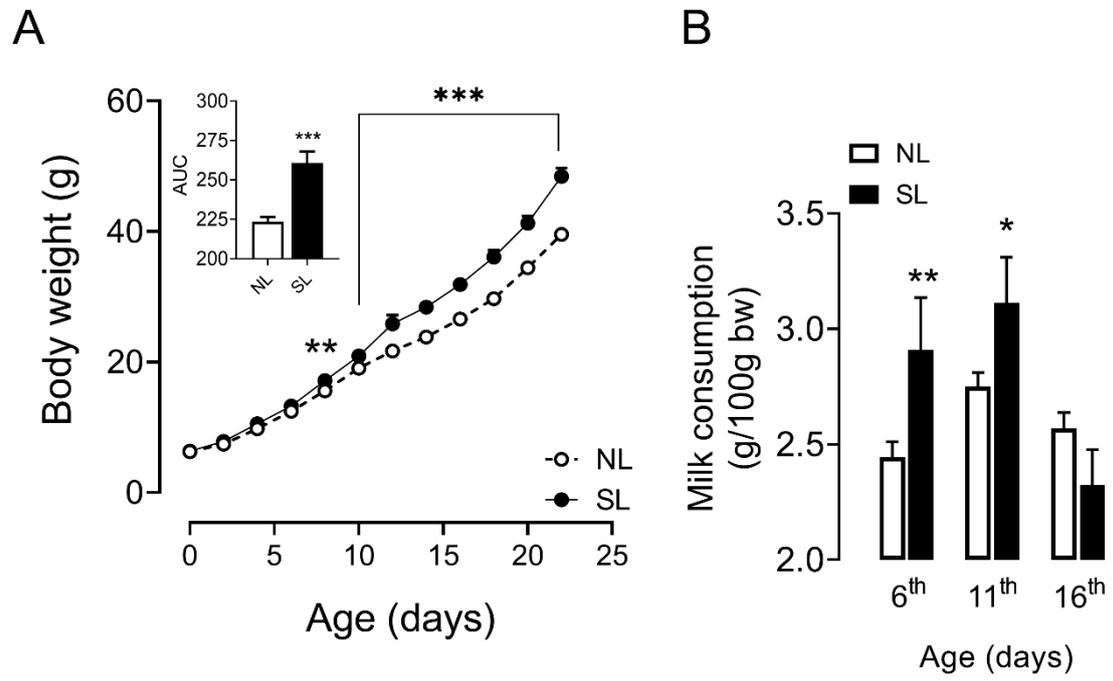


Figure 2

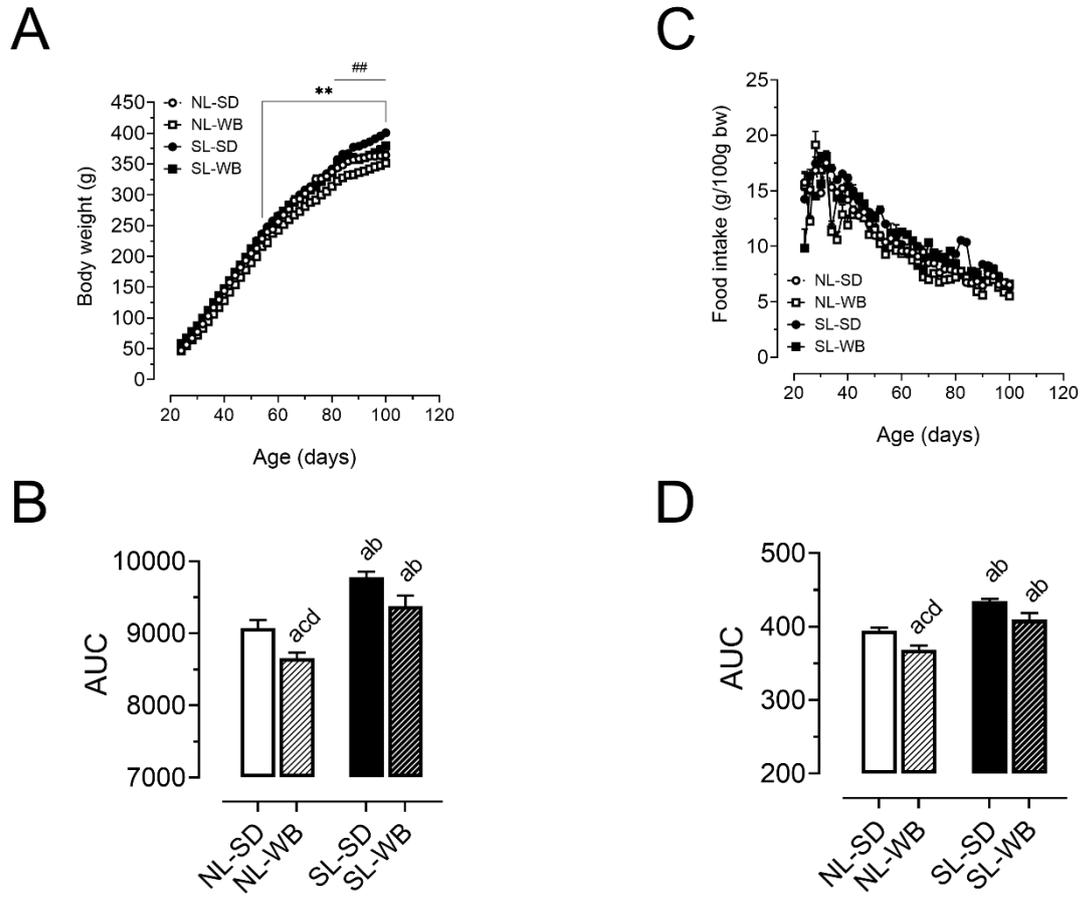


Figure 3

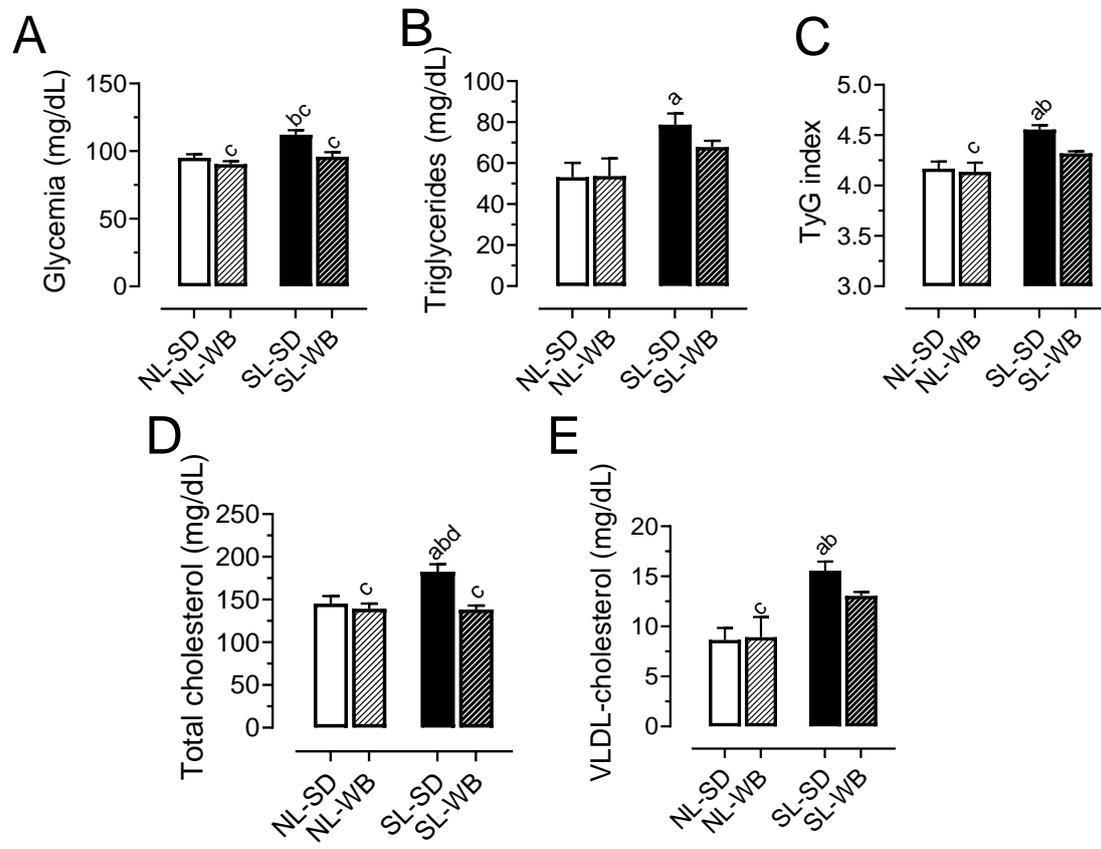


Figure 4

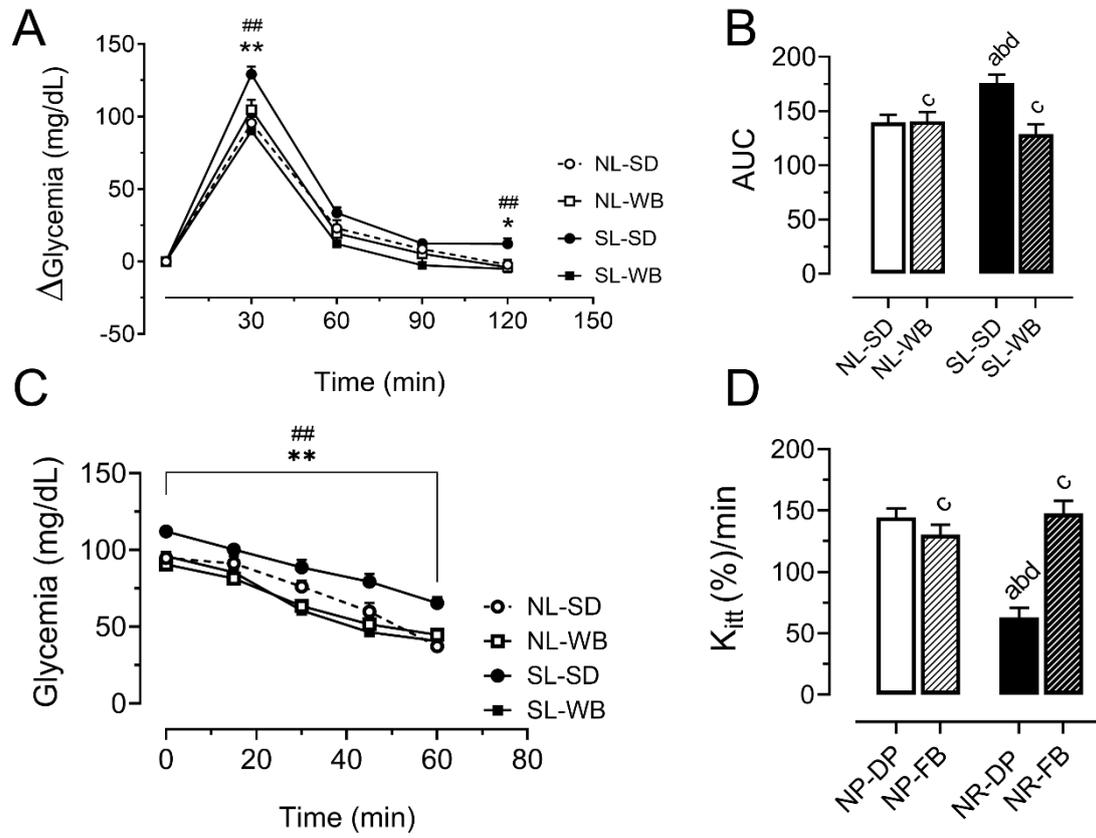


Figure 5

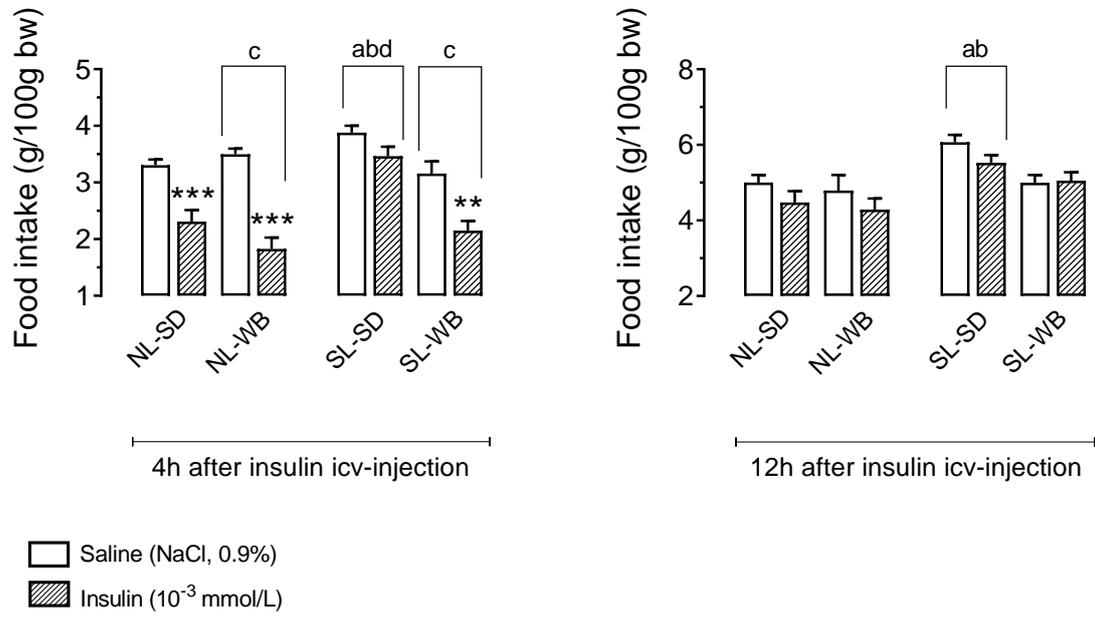


Figure 6

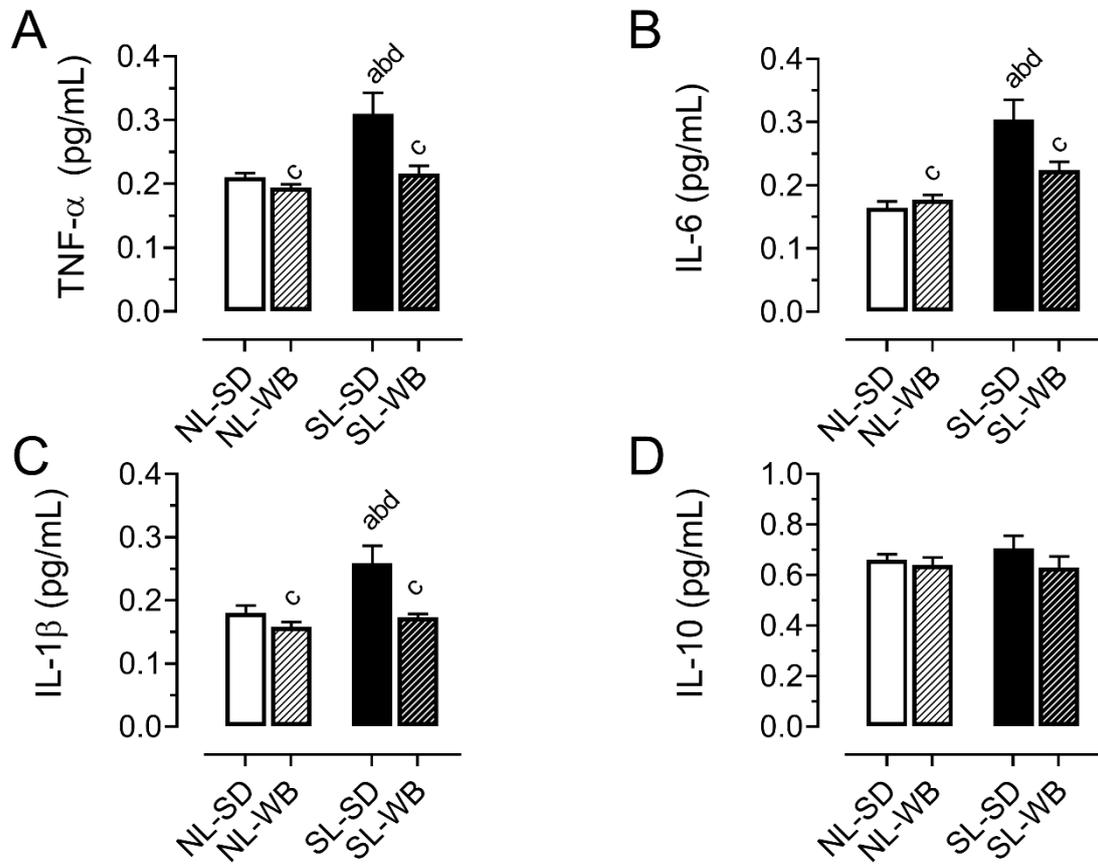


Figure legends

Figure 1. Body weight changes (A) and milk consumption (B) during the suckling period. The insert in figure A depicts the area under the curve (AUC) of body weight change. Data are presented as the mean \pm SEM of 40 rat offspring obtained from at least 8 different litters for NL and from at least 16 different litters for SL group. Statistical analyses were performed with Student's *t*-test, and the symbols above the bars indicate significant differences between groups, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. NL, rat offspring whose mothers were nursing 8 pups throughout lactation; SL, rat offspring whose mothers were nursing 3 pups throughout lactation.

Figure 2. Body weight evolution (A) and food intake (C) from weaning until adulthood. The area under the curves (AUCs) of body weight (A) and food intake (C) are presented in figures B and D, respectively. The data are expressed as the means \pm SEM and were obtained from 28-32 rats of the 4 different litters in NL group and 24 rats of the 8 different litters in SL group. Statistical analyses point-by-point in body weight curves were performed with Student's *t*-test, and the symbols above the lines indicate significant differences, where ** $P < 0.01$ depicts difference between NL-SD *versus* SL-SD and [#] $P < 0.01$ depicts difference between SL-SD *versus* SL-WB. All the differences obtained in data from AUCs were analyzed with one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, and the letters above the bars indicate significant differences among groups. a) NL-SD, normal litter fed a standard diet; b) NL-WB, normal litter fed a white bean-supplemented diet; c) SL-SD, small litter fed a standard diet and d) SL-WB, small litter fed a white bean-supplemented diet.

Figure 3. Biochemical parameters of the adult rat offspring. Data are presented as the mean \pm SEM of 12 rat offspring fasted for 12 hours (3 rats from each of four different litters for each group). The glycemia (A), triglycerides (B), TyG index (C), total cholesterol (D), HDL cholesterol (E) and total proteins (F). Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, and the letters above the bars indicate significant differences among groups. a) NL-SD, normal litter fed a standard diet; b) NL-WB, normal litter fed a white bean-supplemented diet; c) SL-SD, small litter fed a standard diet and d) SL-WB, small litter fed a white bean-supplemented diet.

Figure 4. Glucose-insulin homeostasis during the intraperitoneal glucose (ipGTT) and insulin tolerance (ipITT) tests. Data are given as the mean \pm SEM of 12 rats from 4 different litters. The area under the curve (AUC) of the glycemia increment during the ipGTT (Fig. A) is showed in as Fig. B. The rate of blood glucose uptake (K_{it}) during the ipITT (Fig. C) is showed as Fig. D. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, and the symbols above the lines * P <0.05, ** P <0.01, indicate significant differences between NL-SD and SL-SD, as well as # P <0.05, ## P <0.01, depicts significant differences between SL-WB and SL-SD. The letters above the bars indicate significant differences among groups. a) NL-SD, normal litter fed a standard diet; b) NL-WB, normal litter fed a white bean-supplemented diet; c) SL-SD, small litter fed a standard diet and d) SL-WB, small litter fed a white bean-supplemented diet.

Figure 5. *Ad libitum* food intake in 6 hours fasted (1:00 PM–7:00 PM) rats, 4 hours (at 11:00 PM) and 12 hours (at 7:00 AM) after saline or insulin intracerebroventricular (icv) injection. The data are expressed as the means \pm SEM of 8 rats from 4 different litters in each experimental group. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test for the batch of data at 4 hours and by Kruskal-Walli's test for the batch of data at 12 hours after the icv injection). The symbols above the bars ** P <0.01 and *** P <0.001 indicate significant differences between saline and insulin effect in NL-SD, NL-WB and SL-WB rats. The letters above the bars denote significant differences among the groups. a) NL-SD, normal litter fed a standard diet; b) NL-WB, normal litter fed a white bean-supplemented diet; c) SL-SD, small litter fed a standard diet and d) SL-WB, small litter fed a white bean-supplemented diet.

Figure 6. Hypothalamic inflammatory cytokine levels. Data are expressed as the means \pm SEM of 6 rats from 3 different litters in each experimental group. The tumor necrosis factor alpha (TNF- α , figure A), interleukin 6 (IL-6, B), interleukin 1 beta (IL-1 β , C) an interleukin 10 (IL-10, D). Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test, and the letters above the bars denote significant differences among the groups. a) NL-SD, normal litter fed a standard diet; b) NL-AE, normal litter fed an okra-supplemented diet; c) SL-SD, small litter fed a standard diet and d) SL-AE, small litter fed an okra-supplemented diet.

ANEXO A – Autorização do Comitê de Ética

17/03/2021

SEI/UFMT - 3307542 - Despacho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

DESPACHO

Processo nº 23108.089573/2020-23

Interessado: JULIO CEZAR DE OLIVEIRA, Comitê de Ética no Uso de Animais - UFMT



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO

Certificamos que o Protocolo Nº 23108.089573/2020-23 sobre "Intervenções preventivo-terapêuticas: Efeito da suplementação dietética com feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre o metabolismo de ratos induzidos à obesidade", sob a responsabilidade do (a) Júlio Cezar de Oliveira, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)-UFMT em reunião ordinária de 26 de fevereiro de 2021.

We certify that the protocol 23108.089573/2020-23, entitled "Intervenções preventivo-terapêuticas: Efeito da suplementação dietética com feijão branco (*Phaseolus vulgaris* L.) sobre o metabolismo de ratos induzidos à obesidade", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals (Federal University of Mato Grosso – UFMT) on 26th february 2021.

Número de animais experimentados: 430 ratos

Number of experimented animals: 430 rats

Validade até 31/01/2024



17/03/2021

SEI/UFMT - 3307542 - Despacho

Cuiabá-MT, 05 de março de 2021.

PROFA. DRA. MICHELLE IGARASHI WATANABE**PRESIDENTE****PROF. DR. KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR****VICE-PRESIDENTE**

Documento assinado eletronicamente por **MICHELLE IGARASHI, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 05/03/2021, às 08:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **KLEDIR ANDERSON HOFSTAETTER SPOHR, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 05/03/2021, às 18:03, 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.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3307542** e o código CRC **A42B02D5**.

Referência: Processo nº 23108.089573/2020 23

SEI nº 3307542