

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

**ADOLESCÊNCIA COMO JANELA DE
PROGRAMAÇÃO METABÓLICA: EFEITO DE
CURTO E LONGO PRAZO DA DESNUTRIÇÃO EM
AMBOS OS SEXOS**

JOSKAME SAINT PAUL

Sinop, Mato Grosso
Janeiro, 2024

JOSKAME SAINT PAUL

**ADOLESCÊNCIA COMO JANELA DE
PROGRAMAÇÃO METABÓLICA: EFEITO DE
CURTO E LONGO PRAZO DA DESNUTRIÇÃO EM
AMBOS OS SEXOS**

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
Janeiro, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

P324a Paul, Joskame Saint.

Adolescência como janela de programação metabólica: efeito de curto e longo prazo da desnutrição em ambos os sexos [recurso eletrônico] / Joskame Saint Paul. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 89 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientador: Júlio Cezar de Oliveira.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.

Inclui bibliografia.

1. desnutrição. 2. programação metabólica. 3. estado redox. I. de Oliveira, Júlio Cezar, orientador. II. 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: "Adolescência como janela de programação metabólica: efeito de curto e longo prazo da desnutrição em ambos os sexos"

AUTOR (A): Joskame Saint Paul

Dissertação defendida e aprovada em **31 de Janeiro de 2024**.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Doutor(a) Júlio Cezar de Oliveira (Presidente Banca)
2. Doutor(a) Júlio Cezar de Oliveira (Orientador(a))
3. Doutor(a) Paulo Cezar de Freitas Mathias (Examinador(a) Externo(a))
4. Doutor(a) Carlos Alberto Ibáñez Chávez (Examinador(a) Externo(a))
5. Doutor(a) Valéria Dornelles Gindri Sinhorin (Examinador(a) Suplente)
6. Doutor(a) Ananda Malta Lourenzon (Examinador(a) Suplente)

Sinop, 31/01/2024.



Documento assinado eletronicamente por **PAULO CEZAR DE FREITAS MATHIAS, Usuário Externo**, em 15/02/2024, às 12:59, 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 16/02/2024, às 11:05, 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 **Carlos Alberto Ibáñez Chávez, Usuário Externo**, em 26/02/2024, às 17:08, 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 **6548603** e o código CRC **4D239C6C**.

AGRADECIMENTOS

Ao estimado orientador e coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciência em Saúde (PPGCS), Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira, pela dedicação, profissionalismo, paciência e compreensão, pelo tempo disponibilizado para me orientar e aconselhar, e finalmente pelo carinho oferecido durante todo o caminho percorrido até a integralização do curso.

À estimada Professora Dra. Valéria Dornelles Gindri Sinhorin pelos ensinamentos e oportunidade de ampliar meus conhecimentos através da colaboração científica em seu laboratório. Seus ensinamentos e apoio contribuíram muito para a concretização deste trabalho.

À Jeová primeiro, aos meus pais e familiares que sempre torceram pelo meu sucesso, e que entenderam a minha ausência em alguns momentos. Meus mais sinceros agradecimentos, pelo apoio e incentivo. Frequentemente, meu cansaço e preocupações foram sentidos e compartilhados por vocês.

Ao meu marido Agrônomo Paul Saint Paul, que sempre torceu pelo meu sucesso, me incentivou e me acompanhou neste projeto de vida e aperfeiçoamento profissional.

Aos meus queridos e estimados colegas-colaboradores do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS), que fizeram o possível para a realização desse trabalho, pelo esforço, dedicando-se horas e dias para cuidar dos ratos, marcadas pelo espírito associativo e de solidariedade: Mariele de Oliveira Souza, Antonio José Rocha Ribeiro, Manoela Fontenele Antunes, Ana Caroline Schoenberger Kipper, Karoline Paiva da Silva, Aline Milena Dantas Rodrigues e a minha colega Thiara Chaves dos Santos pela dedicação e por toda ajuda na coleta e dosagem bioquímica dos meus dados.

À minha amiga Ezineide de Jesus, que sempre acreditou em mim, me incentivou e me apoiou nos momentos difíceis, e me fez entender que momentos difíceis não são sinônimos de desistência, mas que nos permitem nos fortalecer e lutar pelos nossos sonhos.

Ao meu querido filho Josmy que foi meu companheiro científico em cada instante, sempre me acompanhou em cada ação e atividade realizada para a concretização deste trabalho.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e o Grupo de Cooperação Internacional das Universidades Brasileiras (GCUB) por me permitirem realizar este estudo e obter a bolsa de mestrado.

À SECRI por toda a atenção e suporte durante esta jornada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo importante apoio financeiro, concedendo a bolsa de mestrado.

“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas sonhar, mas também agir; não apenas acreditar, mas também planejar. Só depois disso se tornará realidade. ”

(Anatole France)

RESUMO

A desnutrição, ainda hoje, é um grave problema no mundo, tendo não só implicações sociais, mas também de saúde. Dentre as consequências associadas à fome crônica estão a maior vulnerabilidade imunológica e danos fisiológicos associados à programação de disfunções metabólicas, principalmente quando ocorrida em fases críticas do desenvolvimento. Nesse trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de curto e longo prazo da desnutrição calórica, durante adolescência em ratos machos (M) e fêmeas (F), sobre parâmetros metabólicos, composição corporal, homeostase glicêmica e estado redox. Aos 30 dias de vida, ratos Wistar foram submetidos à restrição alimentar (grupo RA50) até os 60 dias de vida, reduzindo-se a oferta alimentar em 50% da quantidade diária ingerida pelo grupo controle (CONT) que teve oferta *ad libitum*. A evolução ponderal, ingestão alimentar e hídrica foram aferidas a cada dois dias. Tanto aos 60 quanto aos 120 dias de vida, os animais foram submetidos ao teste intraperitoneal de tolerância à glicose (ipGTT) e insulina (ipITT). Ao serem eutanasiados, dissecou-se o fígado e tecido adiposo marrom interescapular para avaliação do estado redox (catalase, CAT; superóxido dismutase, SOD; glutathione S-transferase, GST; glutathione reduzida, GSH; vitamina C; peroxidação lipídica, TBARS; e carbonil), bem como o tecido adiposo branco (gorduras retroperitoneal, mesentérica e perigonadal) e músculos esqueléticos sóleo e extensor longo dos dedos (EDL) para avaliação da composição corporal. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animais. Observou-se redução na evolução ponderal em 36%, em 45% no peso corporal, e em 30% na ingestão alimentar nos RA50-M *versus* CONT-M e redução em 22% na evolução ponderal, em 22% na ingestão alimentar, nas RA50-F *versus* CONT-F durante o tratamento ($P<0,001$). Ao término da desnutrição, observou-se redução de 45% no peso corporal do grupo RA50-M *versus* CONT-M e de 28% no peso do grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,001$). Durante o período pós-desnutrição observou-se redução de 15% na evolução ponderal, aumento da ingestão alimentar em 27% do grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P<0,001$) e 33% nas ratas RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,001$). Durante o ipGTT, em relação a seus respectivos controles, os grupos RA50-M e RA50-F apresentaram hipoglicemia ($-22,50\%$, $P<0,05$). Em relação aos ratos CONT-M, os RA50-M apresentaram Kitt aumentado em 316% e índice de adiposidade em 29% , enquanto o índice de massa magra reduziu em 19% ($P<0,05$). O fígado dos ratos RA50-M aumentou 10% em relação aos CONT-M e 13% nas ratas RA50-F em relação às CONT-F ($P<0,05$). Em relação aos CONT-M, os ratos RA50-M apresentaram redução de 41% SOD, de 31% na CAT, de 27% na GST e de 28% GSH ($P<0,01$). Observou-se aumento de $22,51\%$ no colesterol total das ratas RA50-F *versus* CONT-F, de $48,31\%$ no colesterol LDL dos RA50-M *versus* CONT-M e de $26,73\%$ nas ratas RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,01$). Observou-se redução de $36,12\%$ no colesterol HDL do grupo RA50-M *versus* CONT-M e de $84,17\%$ nas fêmeas RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,05$). Ratos adultos, que sofreram desnutrição na adolescência, têm maior adiposidade visceral associada à menor proteção redox, hipersensibilidade periférica à insulina e maior fatores de risco para doenças cardiovasculares.

Palavras-chave: desnutrição; programação metabólica; estado redox.

ABSTRACT

Malnutrition is still a serious problem in the world today, with not only social but also health implications. Among the consequences associated with chronic hunger are increased immunological vulnerability and physiological damage associated with the programming of metabolic dysfunctions, especially when it occurs at critical stages of development. This study aimed to evaluate the short- and long-term effects of caloric malnutrition during adolescence in male (M) and female (F) rats on metabolic parameters, body composition, glycemic homeostasis and redox state. At 30 days-old, Wistar rats underwent food restriction (FR50 group) until 60 days-old, by reducing food supply by 50% of the daily amount ingested by the control group (CONT) that fed *ad libitum*. Weight gain, food and water intake were measured every two days. At both 60 and 120 days-old, the animals underwent intraperitoneal glucose tolerance (ipGTT) and insulin (ipITT) test. At euthanasia, the liver and interscapular brown adipose tissue were dissected to assess the redox state (catalase, CAT; superoxide dismutase, SOD; glutathione S-transferase, GST; reduced glutathione, GSH; vitamin C; lipid peroxidation, TBARS; and carbonyl), as well as the white adipose tissue (retroperitoneal, mesenteric and perigonadal fat) and soleus and extensor digitorum longus (EDL) skeletal muscles to assess body composition. The procedures were approved by the Animal Ethics Committee. A 36% reduction in weight gain, 45% in body weight, and 30% in food intake were observed in RA50-M *versus* CONT-M, and 22% reduction in weight gain and 22% in food intake in RA50-F *versus* CONT-F during treatment ($P<0.001$). At the end of malnutrition, a reduction of 45% in body weight was observed in the RA50-M *versus* CONT-M group and reduction of 28% in weight in the RA50-F *versus* CONT-F group ($P<0.001$). During the post-malnutrition period, a reduction of 15% in weight gain and an increase of 27% in food intake in the RA50-M *versus* CONT-M group ($P<0.001$) and a 33% increase in RA50-F *versus* CONT-F rats ($P<0.001$) were observed. During the ipGTT, in relation to their respective controls, the RA50-M and RA50-F groups presented hypoglycemia (-22.50% , $P<0.05$). In relation to CONT-M rats, RA50-M rats presented Kitt increased by 316% and adiposity index by 29%, while lean mass index decreased by 19% ($P<0.05$). Liver of RA50-M rats increased by 10% in relation to CONT-M and by 13% in RA50-F rats in relation to CONT-F ($P<0.05$). Compared to CONT-M, RA50-M rats presented a reduction of 41% in SOD, 31% in CAT, 27% in GST and 28% in GSH ($P<0.01$). There was a 22.51% increase in total cholesterol in RA50-F *versus* CONT-F rats, a 48.31% increase in LDL cholesterol in RA50-M *versus* CONT-M rats, and a 26.73% increase in RA50-F *versus* CONT-F rats ($P<0.01$). There was a 36.12% reduction in HDL cholesterol in the RA50-M *versus* CONT-M group and 84.17% decrease in RA50-F *versus* CONT-F females ($P<0.05$). Adult rats that suffered malnutrition in adolescence have greater visceral adiposity associated with lower redox protection, peripheral hypersensitivity to insulin, and greater risk factors for cardiovascular disease.

Keywords: malnutrition; metabolic programming; redox state.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Evolução ponderal e peso ao término de cada período experimental-----	30
Figura 2. Ingestão alimentar durante cada período experimental-----	31
Figura 3. Ingestão hídrica durante cada período experimental-----	32
Figura 4. Homeostase glicêmica pós-desnutrição-----	33
Figura 5. Composição corporal aos 60 dias de vida-----	34
Figura 6. Peso relativo de órgãos aos 60 dias de vida-----	35
Figura 7. Marcadores do estado redox hepático aos 60 dias de vida-----	36
Figura 8. Marcadores antioxidantes no tecido adiposo marrom aos 60 dias de vida-----	37
Figura 9. Homeostase glicêmica após recuperação nutricional-----	38
Figura 10. Composição corporal aos 120 dias de vida, após recuperação nutricional-----	40
Figura 11. Peso relativo de órgãos aos 120 dias de vida, após recuperação nutricional-----	41
Figura 12. Marcadores do estado redox hepático aos 120 dias de vida, após recuperação nutricional-----	42
Figura 13. Marcadores antioxidantes no tecido adiposo marrom aos 120 dias de vida-----	43
Figura 14. Homeostase glicêmica aos 60 e 120 dias-----	44
Figura 15. Perfil lipídico aos 60 e 120 dias-----	45
Figura 16. Índice Castelli I e II aos 60 e 120 dias-----	46

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1. Adolescência	13
1.2. Desnutrição calórica: um problema social e de saúde pública	14
1.3. Estresse oxidativo e metabolismo energético	16
1.4. Síndrome metabólica e sua associação à obesidade e resistência à insulina	18
1.5. Resistência à insulina e o diabetes <i>mellitus</i> tipo 2	20
2 OBJETIVOS	22
2.1. Objetivo geral	22
2.2. Objetivos específicos	22
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Animais e condições experimentais	23
3.2. Desnutrição e o modelo experimental	23
3.3. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica	24
3.4. Eutanásia, coleta tecidual e avaliação biométrica e bioquímica	24
3.5. Avaliação do estresse oxidativo	25
3.5.1 Quantificação da atividade da SOD	25
3.5.2 Quantificação da atividade da CAT	26
3.5.3 Quantificação do nível de GSH	26
3.5.4 Quantificação da atividade da GST	26
3.5.5 Quantificação da vitamina C	27
3.5.6 Quantificação do TBARS	27
3.5.7 Quantificação dos níveis de carbonilação de proteínas	27
3.6. Análise estatística	28
4 RESULTADOS	29
4.1. Efeito de curto e longo prazo da desnutrição calórica sobre composição corporal, ingestão alimentar e hídrica	29
4.2. Efeito de curto prazo da desnutrição calórica sobre homeostase glicêmica, composição corporal e estado redox	32
4.3. Efeito de longo prazo da desnutrição calórica sobre homeostase glicêmica, composição corporal e estado redox	37

4.4 Efeito de curto e longo prazo da desnutrição calórica sobre o perfil lipídico, resistência à insulina e risco cardiovascular -----	44
5 DISCUSSÃO -----	47
6 CONCLUSÃO -----	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	54
8 ARTIGO -----	65

1 INTRODUÇÃO

1.1. Adolescência

A adolescência é geralmente entendida como uma fase da existência caracterizada pela transição entre infância e vida adulta. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS), a adolescência corresponde a faixa etária entre 10 e 19 anos de idade, a qual é definida como um período da vida que merece particular atenção (DE ONIS; ONYANGO; BORCHI; SIYAM *et al.*, 2007). Este período é caracterizado por diversas modificações físicas, comportamentais e psicossociais, entre outras, e é marcada por transformações relacionadas à formação da autoimagem do indivíduo. A diversidade e a intensidade dessas mudanças, aliadas a atitudes de rebeldia, à tentativa de independência, ao desejo de transgressão e à falta de preocupação com um futuro distante podem influenciar os hábitos alimentares e outros comportamentos que tendem a repercutir sobre a saúde e bem-estar dos adolescentes (PINHO; BRITO; SILVA; MESSIAS *et al.*, 2019).

O início da adolescência é caracterizado por mudanças no corpo como resultado da puberdade, que compreende três eventos endócrinos: adrenarca, gonadarca e ativação do eixo de crescimento (BLAKEMORE; BURNETT; DAHL, 2010; DORN, 2006; SPEAR, 2000). Portanto, esta fase é marcada por mudanças drásticas nos níveis hormonais e na aparência física (incluindo rápido crescimento físico, mudanças na estrutura facial e aparecimento de características sexuais secundárias). As mudanças biológicas da puberdade são universais e visíveis, modificando as crianças, dando-lhes altura, forma e sexualidade de adultos. O desenvolvimento pubertário nos seres humanos compreende várias alterações fisiológicas e físicas, incluindo o desenvolvimento de características sexuais secundárias (por exemplo, brotamento mamário nas meninas e aumento dos testículos nos meninos e o crescimento de pelos púbicos) que culminam com o início da competência reprodutiva, por exemplo, ciclos menstruais menarca e ovulatório nas meninas e semenarca ou espermarca nos meninos (MARSHALL; TANNER, 1969; 1970).

Por ser um período de crescimento físico contínuo, de desenvolvimento emocional e de grande plasticidade cerebral, existem fortes indícios de que a experiência de estresse intenso, agudo ou crônico, durante este período crítico da vida, tem efeitos de longo prazo em processos envolvendo as emoções, o comportamento, o crescimento, o metabolismo, a função reprodutiva, o sistema imunológico, bem como função cardiovascular (PERVANIDOU; CHROUSOS, 2011). Tanto o estilo de vida como os mecanismos neuroendócrinos contribuem para o desenvolvimento de alterações metabólicas e outras alterações em indivíduos submetidos a

situação de estresse nessa fase da vida (PERVANIDOU; CHROUSOS, 2012). Por ser uma fase em que ocorrem importantes mudanças diferentes, os adolescentes merecem, atenção redobrada da família, dos educadores e profissionais da saúde, pois é nesta etapa da vida em que podem iniciar diversas disfunções de saúde (PINHO; BRITO; SILVA; MESSIAS *et al.*, 2019).

Quanto ao período de adolescência em ratos, este começa aos 30 dias de vida e se estende até os 60 dias (TOLEDO-RODRIGUEZ; SANDI, 2007). Nas fêmeas de roedores, a primeira fase do desenvolvimento pubertário é marcada tipicamente pelo primeiro sinal externo de atividade ovariana (isto é, abertura vaginal), e a puberdade é considerada completa com o início do estral (primeiro ciclo reprodutivo). Embora variável e dependente das condições de alojamento, por exemplo (VANDENBERGH, 1967; 1969), o dia da abertura vaginal se dá aproximadamente aos 35 dias de vida pós-natal (OJEDA; WHEATON; JAMESON; MCCANN, 1976). Em roedores machos, considera-se como marcador externo do desenvolvimento puberal a separação do prepúcio da glândula do pênis, a qual se dá aproximadamente 42 dias pós-natal; também é tida como marcador a presença de espermatozoides maduros e móveis na cabeça do epidídimo (KORENBROT; HUHTANIEMI; WEINER, 1977).

1.2. Desnutrição calórica: um problema social e de saúde pública

Como foi demonstrado recentemente em um relatório da *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, cerca de 9,2% da população mundial se encontra sob condição de desnutrição crônica, onde se estima que entre 691 e 783 milhões de pessoas sofreram fome só em 2022. Nesse mesmo relatório, projeções atualizadas mostram que cerca de 600 milhões de pessoas estarão com desnutrição crônica até 2030, o que mostra o tamanho do desafio a ser enfrentado para que a meta global dos objetivos de desenvolvimento sustentável, no sentido de erradicação da fome até 2030 seja atingida (FAO, 2023).

Nesse contexto global e somando-se ao cenário da pandemia da COVID-19, o problema da fome se agravou em diversos países do mundo nos últimos três anos (2020 a 2022), atingindo de maneira mais agressiva comunidades socialmente menos assistidas (DZINAMARIRA; DZOBO; CHITUNGO, 2020; PASLAKIS; DIMITROPOULOS; KATZMAN, 2021; PEREZ-ESCAMILLA; CUNNINGHAM; MORAN, 2020). No Brasil, as consequências da pandemia amplificaram a discrepância entre as diferentes realidades sociais coexistentes no país, agravando a segurança alimentar e nutricional da população socialmente menos favorecida (ALPINO; SANTOS; BARROS; FREITAS, 2020; CARVALHO; VIOLA; SPERANDIO, 2021; RIBEIRO-SILVA; PEREIRA; CAMPELLO; ARAGAO *et al.*, 2020; RODRIGUES;

MATOS; HORTA, 2021).

Neste âmbito, com base no conceito DOHaD (sigla do inglês, *Developmental Origins of Health and Disease*) que trata do desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis que surgem tardiamente na vida, devido à exposição a estresse fisiológico em fases críticas do desenvolvimento (VAAG; GRUNNET; ARORA; BRONS, 2012; VAN ABEELLEN; ELIAS; BOSSUYT; GROBBEE *et al.*, 2012), é evidente que a desnutrição, posta aqui como um insulto nutricional, quando ocorrida em fases críticas do desenvolvimento tais como período gestacional (DE OLIVEIRA; GOMES; MIRANDA; BARELLA *et al.*, 2016; PARRELA; BORKENHAGEN; SALMERON; LIMA *et al.*, 2022), período lactacional (DE OLIVEIRA; MIRANDA; BARELLA; TORREZAN *et al.*, 2014; DE OLIVEIRA; SCOMPARIN; ANDREAZZI; BRANCO *et al.*, 2011; MIRANDA; DE LIMA; COSTERMANI; RICKEN *et al.*, 2022) e também na adolescência (DE OLIVEIRA; DE MOURA; MIRANDA; DE MORAES *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA; LISBOA; DE MOURA; BARELLA *et al.*, 2013) levou o indivíduo ao que chamamos de programação metabólica.

Sendo a adolescência um momento crítico do desenvolvimento (SISK; ZEHR, 2005) é válido ressaltar sobre evidências que mostram haver uma relação entre alterações funcional de hormônios sexuais e o surgimento de diabetes *mellitus* tipo 2 e comorbidades associadas (MCINNIS; SMITH; HUNGER; SAUNDERS *et al.*, 2012; SAAD; YASSIN; DOROS; HAIDER, 2016). Mudanças ocasionadas devido a carência energética e por conseguinte pela alteração na ação de hormônios metabólicos como grelina, leptina, insulina e glicocorticoides podem promover alterações fenotípicas que levam o indivíduo a um processo de “adaptação metabólica”, o qual age no sentido de prevenir o organismo de danos maiores devido a carência nutricional (GRIFFIN, 2015). Contudo, após um período de restrição calórica, no entanto, essa adaptação metabólica no intuito da prevenção fisiológica do organismo nem sempre se dá de modo compatível com um *status* mais saudável, no período pós-insulto. Desta forma, ocorre uma reprogramação funcional de eixos endócrinos importantes como eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA) e o hipotálamo-hipófise-gonadal (eixo HPG) que podem agir influenciando o metabolismo, uma vez que há relação funcional recíproca entre ambos os eixos (BRETON, 2013; VIAU, 2002).

A desnutrição proteica e/ou energético-calórica está entre um dos principais fatores de risco para o surgimento de doenças metabólicas, especialmente por modular o padrão de transcrição e expressão de genes relacionados com a regulação de muitas das vias do metabolismo energético (BURDGE; HANSON; SLATER-JEFFERIES; LILLYCROP, 2007). Alterações epigenéticas, em humanos, cujas mães, durante gravidez, foram expostas à

desnutrição severa no período da fome holandesa (HEIJMANS; TOBI; STEIN; PUTTER *et al.*, 2008) são as evidências mais contundentes de que a carência de nutrientes e aporte energético modula o padrão da expressão gênica. E mesmo, durante a adolescência também já foram relatadas tais respostas na literatura científica (VAAG; GRUNNET; ARORA; BRONS, 2012; VAN ABEELLEN; ELIAS; BOSSUYT; GROBBEE *et al.*, 2012). Estas observações clínicas e experimentais (LILLYCROP; SLATER-JEFFERIES; HANSON; GODFREY *et al.*, 2007) contribuem de modo satisfatório para o fato de que a fase pré-natal e a adolescência são uma importante janela de programação para disfunções metabólicas (HOLDER; BLAUSTEIN, 2014).

Um estresse desenvolvido por uma desnutrição na adolescência, como por exemplo situações de anorexia nervosa, ou até mesmo estresse emocional, que são eventos bastante comuns durante essa fase da vida (MISRA; KLIBANSKI, 2016), podem deixar marcas metabólicas condizentes com o surgimento de síndrome metabólica tardiamente, já que podem influenciar a homeostase de sistemas endócrinos em maturação nesse período (DE OLIVEIRA; DE MOURA; MIRANDA; DE MORAES *et al.*, 2018; PERVANIDOU; CHROUSOS, 2012).

1.3. Estresse oxidativo e metabolismo energético

Como demonstrado recentemente na literatura, o estresse fisiológico desenvolvido pela desnutrição energético-calórica, em fases críticas do desenvolvimento, programa nos indivíduos um desequilíbrio redox tecidual, levando a condição de estresse oxidativo (LAZNIEWSKA; DARBY; HOLMAN; SORVINA *et al.*, 2021; XUE; GUO; HU; ZHU *et al.*, 2020).

O organismo possui um sistema de proteção antioxidante, como mecanismo de defesa contra os radicais livres. Os radicais livres (átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, fato que lhes confere sua característica reativa) são constantemente produzidos no organismo a partir das reações do metabolismo energético (RADI, 2018), os quais, quando em excesso, levam órgão, tecidos e/ou células ao estresse oxidativo, causando diversos prejuízos ao organismo (LAN; HUANG; HAN; SHAO *et al.*, 2018).

Os radicais livres têm um número ímpar de elétrons e isso os torna agentes altamente reativos e instáveis, podendo reagir rapidamente com outras substâncias tentando capturar o elétron necessário para obter estabilidade. Dessa forma, atacam moléculas estáveis mais próximas, “roubando” seus elétrons e convertendo a molécula atacada em um radical livre, que por sua vez promove uma cascata de reações em cadeia causando danos celulares no organismo

(REUTER; GUPTA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2010). Esses radicais podem ser produzidos nas células pela perda ou aceitação de um único elétron, comportando-se, portanto, como oxidantes ou redutores (LOBO; PATIL; PHATAK; CHANDRA, 2010). Na grande maioria das vezes as espécies reativas do oxigênio são produzidas nas células através da cadeia respiratória mitocondrial (POYTON; BALL; CASTELLO, 2009; REUTER; GUPTA; CHATURVEDI; AGGARWAL, 2010).

Portanto, o estresse oxidativo é uma condição na qual se instala um desequilíbrio significativo entre a produção de espécies reativas de oxigênio e o nível de antioxidantes, resultando em deterioração das células pela ação das espécies reativas de oxigênio em excesso (GANDHI; ABRAMOV, 2012). A condição de estresse oxidativo pode se desenvolver em um sistema fisiológico por diversas causas, as quais de modo geral estão associadas à ação de fatores exógenos (por exemplo, exposição ambiental a agentes oxidantes e ingestão inadequada de agentes antioxidantes) e endógenos (por exemplo, alterações enzimáticas e processos patológicos (PANDE; NEGI; KARKI; KHANNA *et al.*, 2012). Na condição de estresse oxidativo, todos os componentes celulares vitais, como DNA, proteínas e lipídios de membrana, estão sujeitos a danos que podem, inclusive, levar à morte celular, e com isso podendo resultar em inúmeras doenças metabólicas tais como o diabetes *mellitus* tipo 2, doenças cardiovasculares, inflamação, câncer, doenças degenerativas, isquemia e anemia (RAVIPATI; ZHANG; KOYYALAMUDI; JEONG *et al.*, 2012). Na contramão dos fatores que produzem as espécies reativas do oxigênio, os sistemas biológicos são equiparados de um sistema de defesa antioxidante, que atuam como as principais defesas contra os radicais livres.

A resposta antioxidante do organismo se dá por uma variedade de macromoléculas que atuam na inibição, redução e/ou restauração de lesões causadas pelas espécies reativas do oxigênio nos diferentes sistemas biológicos, sendo, portanto, formado por componentes enzimáticos e não enzimáticos.

O sistema de defesa antioxidante enzimático é formado por diferentes enzimas tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione-S-transferase (GST) que atuam promovendo a desintoxicação do organismo gerada pelos radicais livres (JONES, 2006; LIGUORI; RUSSO; CURCIO; BULLI *et al.*, 2018).

Em humanos existem três isoformas da SOD. A SOD1 (Cu-Zn-SOD) que é uma enzima solúvel presente no citoplasma e no espaço intermembranar mitocondrial; a (SOD₂) (Mn-SOD) existente na matriz mitocondrial e a (SOD₃) que é secretada no espaço extracelular. Todas estas isozimas catalisam a dismutação de radical superóxido (O₂•⁻) em peróxido de hidrogênio em (H₂O₂) e oxigênio (O₂) (MUNZEL; CAMICI; MAACK; BONETTI *et al.*, 2017). A CAT,

composta de um tetrâmero de quatro polipeptídeos, que em virtude de 4 grupos de ferro heme porfirina, atua catalisando a decomposição de H_2O_2 em oxigênio e água (MUNZEL; CAMICI; MAACK; BONETTI *et al.*, 2017). Há também glutathiona redutase, que faz uso do NADPH para converter a glutathiona oxidada (GSSG) em glutathiona reduzida (GSH). Por sua vez, a GSH é um cofator usado pela enzima glutathiona peroxidase (GPx), a qual existe em 8 isoformas no organismo (GPx1, GPx2, até GPx8) e essa enzima atua reduzindo o H_2O_2 a água e peróxidos lipídicos em seus respectivos álcoois.

Fisiologicamente, muitos compartimentos celulares atuam como sistema de defesa antioxidante, promovendo redução de radicais livres, por meios não enzimático (KREUZ; FISCHLE, 2016). Dentre estes pode-se citar os compostos antioxidantes de origem dietética tais como vitaminas, minerais e compostos fenólicos. O ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E) e β -caroteno (pro-vitamina A) são compostos vitamínicos potencialmente antioxidantes (LIGUORI; RUSSO; CURCIO; BULLI *et al.*, 2018). Há evidências que atestam a importância de se manter uma alimentação saudável e minimamente adequada para assegurar a ingestão de antioxidantes exógenos no sentido de melhorar o dano causado pelo estresse oxidativo (BAIANO; DEL NOBILE, 2016).

1.4. Síndrome metabólica e sua associação à obesidade e resistência à insulina

Com a presença constante de estresse oxidativo no organismo, o surgimento de desequilíbrios nos sistemas metabólicos é inevitável. Neste contexto emerge a síndrome metabólica, também conhecida como síndrome X, síndrome plurimetabólica e síndrome de resistência à insulina, já que seu desenvolvimento se constitui de uma variedade de fatores de risco para doenças cardiovasculares, sendo um transtorno metabólico representado por hipertensão arterial sistêmica, deposição central de gordura (obesidade), dislipidemia (aumento dos níveis de colesterol total, colesterol LDL e triglicerídeos, bem como redução do colesterol HDL) e resistência à insulina (ALBERTI; ECKEL; GRUNDY; ZIMMET *et al.*, 2009).

A síndrome metabólica está associada a outras comorbidades, incluindo estado pró-trombótico, estado pró-inflamatório, doença hepática gordurosa não alcoólica e distúrbios reprodutivos (CORNIER; DABELEA; HERNANDEZ; LINDSTROM *et al.*, 2008). Tem-se observado uma incidência global de síndrome metabólica paralela à da obesidade e do diabetes *mellitus* tipo 2. Embora não haja dados globais contundentes quanto a síndrome metabólica tal como tem para o diabetes *mellitus* tipo 2 e obesidade, estima-se que sua prevalência esteja em torno 25% da população mundial, uma vez que a síndrome metabólica é cerca de três vezes

mais comum que o diabetes (SAKLAYEN, 2018).

Na juventude, a síndrome metabólica é posta como um importante preditor de risco futuro de diabetes e doenças cardiovasculares (ZIMMET; ALBERTI; KAUFMAN; TAJIMA *et al.*, 2007). Neste sentido, vem sendo reportado por pesquisadores de referência do *Bogalusa Heart Study* que os fatores de risco cardiovascular presentes na infância são preditivos de doença arterial coronariana na idade adulta (BERENSON; SRINIVASAN; BAO; NEWMAN *et al.*, 1998; LI; CHEN; SRINIVASAN; BOND *et al.*, 2003).

Evidências substanciais apontam para a obesidade como sendo o principal determinante da resistência à insulina em crianças (CAPRIO, 2002). Essa associação aumenta o risco não apenas de síndrome metabólica na idade adulta (SUN; LIANG; HUANG; DANIELS *et al.*, 2008), mas também de doenças cardiovasculares e diabetes *mellitus* tipo 2 (BAKER; OLSEN; SORENSEN, 2007; DAVIS; DAWSON; RILEY; LAUER, 2001). Contudo além dos fatores de risco subjacentes predominantes para a síndrome metabólica, tais como a obesidade (CARR; UTZSCHNEIDER; HULL; KODAMA *et al.*, 2004; LEMIEUX; PASCOT; COUILLARD; LAMARCHE *et al.*, 2000) e a resistência à insulina (REAVEN, 1988), hábitos de vida não saudáveis como o sedentarismo (GUSTAT; SRINIVASAN; ELKASABANY; BERENSON, 2002; PARK; ZHU; PALANIAPPAN; HESHKA *et al.*, 2003) e por vezes desequilíbrio hormonal (APRIDONIDZE; ESSAH; IUORNO; NESTLER, 2005) também parecem contribuir para o surgimento da síndrome metabólica.

A obesidade é um dos principais problemas de saúde em todo o mundo na atualidade e é reconhecida pela OMS como uma doença crônica não transmissível de proporção global, caracterizada pelo excesso de gordura corporal (WHO, 2021), a qual, em especial a gordura corporal visceral, tem associação direta com citocinas inflamatórias e pode causar diversos danos à saúde humana (STRANAHAN, 2022). Considerada um distúrbio metabólico multifatorial, essa doença tem se mostrado muito prevalente nos países desenvolvidos, mas nos últimos anos aumentou dramaticamente nos países em desenvolvimento (NG; FLEMING; ROBINSON; THOMSON *et al.*, 2014). Se continuar no mesmo ritmo até 2030, os números podem subir para um total de 2,16 bilhões de indivíduos com sobrepeso e 1,12 bilhões de obesos, o que corresponde a 38% e 20% da população adulta mundial, respectivamente (KELLY; YANG; CHEN; REYNOLDS *et al.*, 2008), fato que implica um grande risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis associadas (tais como doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, doença renal crônica, dislipidemia, hipertensão, doença hepática gordurosa não alcoólica, alguns tipos de câncer, apneia obstrutiva do sono, osteoartrite e a própria síndrome metabólica, incluindo também maior vulnerabilidade às

complicações de COVID19 grave (AASETH; ELLEFSEN; ALEHAGEN; SUNDFOR *et al.*, 2021; KUMANYIKA, 2022; WIECHERT; HOLZAPFEL, 2021).

1.5. Resistência à insulina e o diabetes *mellitus* tipo 2

Segundo a OMS, estima-se que aproximadamente de 422 milhões de adultos são diabéticos no mundo, sendo que entre estes cerca de 90% são portadores do diabetes *mellitus* tipo 2; cerca de 80% vivem em países de renda baixa e/ou média, em torno de 1,6 milhões de mortes, ao ano no mundo, as quais são atribuídas diretamente ao diabetes (WHO, 2020).

Fisiologicamente o pâncreas, além de suas funções digestivas, secreta dois hormônios importantes, insulina e glucagon, cruciais para a regulação normal do metabolismo da glicose, dos lipídios e das proteínas. A insulina é sintetizada nas células beta pancreáticas, encontradas principalmente no centro das ilhotas de Langerhans, sendo secretada imediatamente após refeição rica em carboidratos. A glicose absorvida para o sangue adentra às células beta pancreáticas causando a secreção rápida de insulina. A insulina, por sua vez, causa a pronta captação, armazenamento e utilização da glicose por quase todos os tecidos do organismo, começando pelo músculo esquelético e pelo tecido adiposo branco dependentes de GLUT4, ao passo que no fígado promove efeitos anabólicos (tais como ativação da biossíntese de glicogênio e proteínas), enquanto inibe o catabolismo, por exemplo a lipólise (BANSAL; WANG, 2008; BARTHEL; SCHMOLL, 2003). No entanto, no cenário de resistência à insulina, a insulina é incapaz de suprimir adequadamente a lipólise, resultando na liberação mais acentuada de ácidos graxos livres no plasma (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005).

A falha na função fisiológica da insulina sobre seus receptores, leva a quebra na homeostase e regulação da glicose, levando o indivíduo à condição de diabetes *mellitus* tipo 2 e muitas vezes a outras comorbidades associadas a resistência à insulina, tal como doenças cardiovasculares (LAUTERBACH; WUNDERLICH, 2017). Nesta condição, os níveis de insulina aumentam para atender às necessidades metabólicas que normalmente seriam exercidas pelos níveis basais e/ou pós-prandial da insulina, levando à hiperinsulinemia crônica, e geralmente à insuficiência de células beta pancreáticas induzida por hiperglicemia, tendo como consequência o desenvolvimento da condição diabética (KAHN, 2003; WANG; ZHOU; LAM; XU, 2009). Na ausência de ação adequada da insulina, o organismo age tal como se estivesse em uma condição de jejum. Como se sabe, no estado de jejum, o fígado (através dos processos de produção hepática de glicose) secreta glicose no sangue para manter a euglicemia, com isso fornecendo o combustível necessário para o funcionamento dos tecidos dependentes de glicose,

através da glicogenólise e da gliconeogênese (NORTON; SHANNON; GASTALDELLI; DEFRONZO, 2022; RUI, 2014).

Diante do exposto, quanto aos diferentes tipos de doenças metabólicas que acometem o organismo, faz-se necessário investigar as possíveis causas envolvidas em sua origem. Em adição, considerando-se a adolescência uma fase crítica do desenvolvimento, nossa hipótese é que a desnutrição crônica durante a adolescência seja um fator de estresse fisiológico capaz de induzir alterações metabólicas em curto e longo prazo, as quais estão relacionadas a um desequilíbrio no balanço redox.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito de curto e longo prazo de uma desnutrição calórica, durante adolescência em ratos machos e fêmeas, sobre parâmetros metabólicos, composição corporal, homeostase glicêmica e estado redox.

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a evolução ponderal nos períodos antes, durante e pós-desnutrição.
- ✓ Avaliar a ingestão alimentar nos períodos antes, durante e pós-desnutrição.
- ✓ Avaliar a ingestão hídrica nos períodos antes, durante e pós-desnutrição
- ✓ Avaliar a composição corporal nos períodos pós-desnutrição e pós-recuperação nutricional.
- ✓ Avaliar a homeostase glicêmica nos períodos pós-desnutrição e pós-recuperação nutricional.
- ✓ Avaliar o balanço redox nos períodos pós-desnutrição e pós-recuperação nutricional.
- ✓ Avaliar o perfil lipídico nos períodos pós-desnutrição e pós-recuperação nutricional.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais e condições experimentais

Foram usados ratos Wistar, criados no biotério setorial do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS), da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus* Universitário de Sinop (CIAEP Nº 01.0543.2018). Os experimentos foram desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para uso e Experimentação Animal da Universidade Federal de Mato Grosso (23108.724433/2017-16) 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.

Durante o período experimental, os ratos foram mantidos em condições controladas de temperatura (23 ± 2 °C), umidade ($55\pm 5\%$) e fotoperíodo (12 h de claro, 06:30 às 18:30 h e 12 h de escuro), com água e comida *ad libitum*.

Matrizes foram colocadas para acasalamento na proporção de duas fêmeas para um macho (n=8 ratas matrizes). Ao nascimento, as ninhadas foram padronizadas, de modo a manter-se um número de oito filhotes por mãe lactante, sendo 4 machos e 4 fêmeas durante todo o período de lactação (22 dias). Ninhadas que não tinham 4 fêmeas e 4 machos foram descartadas.

A prole foi pesada a cada dois dias durante toda a lactação e o desmame realizado aos 22 dias de vida da prole, sendo que de cada ninhada, utilizou-se: 2 fêmeas para compor o grupo controle (CONT-F); 2 fêmeas para compor o grupo restrição alimentar em 50% (RA50-F); 2 machos para compor o grupo controle (CONT-M) e 2 machos para compor o grupo restrição alimentar em 50% (RA50-M), sendo mantido o número de 4 ratos por caixa (cada caixa contendo 2 ratos filhos da mesma mãe). Cada grupo experimental foi constituído por um total de 16 ratos diferentes.

3.2. Desnutrição e o modelo experimental

Aos 30 dias de vida, os animais foram divididos em dois grupos, o grupo CONT (machos e fêmeas) que continuaram sendo alimentados *ad libitum* e o grupo submetido à restrição alimentar em 50% da quantidade diária ingerida pelo grupo controle (grupo RA50). Este 50% da ração foi ajustada ao peso deles e foi colocada cada dois dias. O grupo RA50 recebeu apenas 50% da quantidade de ração ingerida pelos animais do grupo CONT pelo período de 30 dias, correspondentes a fase de adolescência, sendo assim desnutridos dos 30 aos 60 dias de vida (DE OLIVEIRA; MIRANDA; BARELLA; TORREZAN *et al.*, 2013). O peso corporal, a ingestão

alimentar e a ingestão hídrica dos animais foram aferidas a cada dois dias, iniciando-se desde o desmame até o término do período experimental, aos 120 dias de vida.

Aos 60 dias de vida, quando então foi finalizado o período de indução do estresse nutricional, metade dos animais foram eutanasiados para avaliação do efeito agudo da desnutrição; enquanto que outra metade foi submetida a recuperação alimentar. Para tal estes animais receberam ração *ad libitum* até a idade de 120 dias de vida e após foram eutanasiados para a coleta de amostras teciduais e sanguíneas (DE OLIVEIRA; MIRANDA; BARELLA; TORREZAN *et al.*, 2013).

3.3. Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica

A avaliação da homeostase glicêmica e insulinêmica foi realizada através do teste de tolerância à glicose intraperitoneal (ipGTT) em ambos os momentos experimentais, aos 60 e aos 120 dias de vida (MATHIAS; MIRANDA; BARELLA; MIRANDA *et al.*, 2020). Após jejum de 12 horas (06:00–18:00h) e sem anestesia foi administrada uma carga de glicose (2g/kg de peso corporal, *i.p.*). Antes da administração de glicose foi feita uma primeira dosagem da glicemia, a partir de gota de sangue da ponta da cauda dos animais, através de glicosímetro digital (Accu-Chek® Performa, Roche) que correspondeu ao tempo zero (*tempo zero, para obtenção da glicemia de jejum*), e então aplicou-se a glicose. Em seguida, após 30, 60, 90 e 120 minutos da aplicação de glicose foram feitas novas dosagens de glicose sanguíneas.

Já o teste de tolerância à insulina intraperitoneal (ipITT), este foi realizado após jejum de 4 horas (14:00–18:00h) e sem efeito de anestesia, foi administrada uma dose de insulina HUMULIN R, suspensão injetável 100U/ml (1 IU/kg de peso corporal, *i.p.*). Antes da administração de insulina foi feita uma primeira dosagem da glicemia, a partir de gota de sangue da ponta da cauda dos animais, através de glicosímetro digital (Accu-Chek® Performa, Roche) que correspondeu ao tempo zero (*tempo zero, para obtenção da glicemia de jejum de 4 horas, 0 min*), e então aplicou-se a insulina. Em seguida, após 15, 30, 45 e 60 minutos da aplicação de insulina foram feitas novas dosagens de glicose sanguíneas (MATHIAS; MIRANDA; BARELLA; MIRANDA *et al.*, 2020).

Enquanto ao Kitt, ela se define como a constante de desaparecimento da glicose no sangue e foi calculada pela fórmula ($Kitt = 0,693/t_{1/2}$) onde ($t_{1/2}$) é o tempo de meia-vida da glicose no sangue após administração da insulina (BONORA; TARGHER; ALBERICHE; BONADONNA *et al.*, 2000).

3.4. Eutanásia, coleta tecidual e avaliação biométrica e bioquímica

Aos 120 dias de vida, ao término dos procedimentos experimentais, os animais sob jejum de 12 horas noturna, foram eutanasiados por decapitação, através de guilhotina para coleta tecidual e sanguínea.

Imediatamente, após a decapitação, amostras de sangue foram coletadas, centrifugadas e o plasma armazenado à -20°C para posterior dosagens bioquímicas (glicemia, índice TyG, avaliação do perfil lipídico (triglicerídeos, colesterol total e lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL) e índice Castelli, através do método da glicose oxidase e respectivamente.

O índice TyG, foi calculado através esta fórmula matemática, é outro parâmetro que capaz de identificar componentes da síndrome metabólica, em especial a resistência à insulina em indivíduos com alto risco de doenças cardiometabólicas (YU; WANG; ZHANG; MING *et al.*, 2019)

Índice TyG = $\text{Ln} [(\text{Trigliceridemia (mg/dL)}) \times (\text{Glicemia (mg/dL)})/2]$, sendo considerado alterado, valores de TyG a partir de 4,42 (LI; REN; CHANG; LUO, 2021). Quanto ao índice Castelli, tanto o I quanto o II foram utilizados para estimar o risco aterogênico e, por conseguinte o desenvolvimento de doenças vasculares.

Utilizando os seguintes cálculos para quantificar o índice Castelli I (colesterol total/colesterol HDL) e o índice Castelli II (colesterol LDL/colesterol HDL) (FAGUNDES; MOURA; PASSOS; SANTOS-SILVA *et al.*, 2009) Em seguida, foram dissecados os principais depósitos de tecido adiposo branco (gordura periepididimal, *nos ratos machos*, periovariana, *nas ratas fêmeas*, mesentérica e retroperitoneal) e amostras de músculo esquelético (músculo sóleo e o músculo extensor longo dos dedos, EDL). A soma destes tecidos foi normalizada por 100g de peso corporal dos ratos [tecido adiposo (periepididimal e/ou periovariana + retroperitoneal + mesentérica)/peso corporal x 100] e [músculo esquelético (sóleo + EDL)/peso corporal x 100] e foi considerada como indicativo do índice de adiposidade e índice da massa magra.

Também foram removidos o tecido adiposo marrom, o fígado, as glândulas adrenais, e o hipotálamo para a realização de análises posteriores, como avaliação do estresse oxidativo.

3.5. Avaliação do estresse oxidativo

A análise do estado redox foi realizada por meio da mensuração dos marcadores de defesa antioxidante (como a atividade das enzimas SOD, CAT e GST e não enzimáticas GSH e vitamina C) e dos marcadores de danos oxidativos [como a peroxidação lipídica, através da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação de

proteínas (Carbonil)]. As análises foram realizadas no Laboratório Integrado de Pesquisas Químicas (LiPEQ), sob a supervisão da Prof.^a Dr. Valéria Sinhorin, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) *Campus* Universitário de Sinop.

Para a normalização dos ensaios, exceto Vitamina C, foi determinada a proteína total das amostras, pelo método de Bradford (1976) à 595 nm, utilizando albumina de soro bovino como padrão.

3.5.1 *Quantificação da atividade da SOD*

A atividade da SOD foi avaliada segundo metodologia já bem estabelecida (MISRA; FRIDOVICH, 1971), na qual a enzima inibe a auto-oxidação do bitartarato de adrenalina. Amostras teciduais (fígado e tecido adiposo marrom) foram diluídas na proporção 1:30 e 1:10 em tampão fosfato de potássio mono/dibásico (K_2HPO_4) 50 mmol/L, pH 7,8. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm à 4 °C por 20 minutos.

A atividade enzimática da SOD foi medida em espectrofotômetro (comprimento de onda de 480 nm). Para tanto foram preparadas uma solução de bitartarato de adrenalina 60 mmol/L e tampão carbonato de sódio (Na_2CO_3) 57 mmol/L. As leituras foram realizadas nos volumes de 10 µL, 25 µL e 50 µL, onde os valores das absorbâncias baixavam conforme aumentava o volume da amostra. O resultado foi expresso como UI SOD/mg proteína.

3.5.2 *Quantificação da atividade da CAT*

A atividade enzimática da CAT foi determinada de acordo com metodologia já bem estabelecida (NELSON; KIESOW, 1972). Amostras teciduais (fígado e tecido adiposo marrom) foram homogeneizadas na proporção 1:30 e 1:10 em solução resfriada de tampão fosfato (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 7,4, com Triton X-100 e cloreto de sódio (NaCl) com auxílio de um homogeneizador dispersor. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm à 4 °C por 15 minutos.

A atividade da CAT foi quantificada em espectrofotômetro (comprimento de onda de 240 nm), a qual se deu através da mensuração da velocidade com que o H_2O_2 foi reduzido à H_2O . Para a realização da leitura da atividade da CAT foram preparados tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0, e H_2O_2 300 mmol/L. O resultado foi expresso como µmol H_2O_2 /min/mg proteína.

3.5.3 *Quantificação do nível de GSH*

Amostras teciduais (fígado e tecido adiposo marrom) foram diluídas na proporção de

1:30 e 1:20 em tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 8,0 com auxílio de homogeneizador dispersor.

Em seguida, 1 mL da amostra homogeneizada foi adicionado a um microtubo de 2 mL, ao qual também foram adicionados 0,8 mL de água destilada e 0,2 mL de ácido tricloroacético 50%, em solução aquosa, e centrifugados à 4.000 rpm à 4 °C por 15 minutos (SEDLAK; LINDSAY, 1968). Após a centrifugação, foram pipetados 0,5 mL do sobrenadante da amostra e adicionado 1 mL de trizma 0,4 mol/L, pH 8,9.

Para a leitura foram adicionados 25 µL de ácido 5,5 ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB) 10 mmol/L e então, fez-se a leitura em espectrofotômetro (comprimento de onda 412 nm) e o resultado expresso como µmol GSH/ mg proteína.

3.5.4 *Quantificação da atividade da GST*

Amostra tecidual (tecido adiposo marrom) foi diluída na proporção de 1:10. Em seguida, foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 7,0 e centrifugadas à 10.000 rpm à 4 °C por 15 minutos. Para leitura, foram preparadas soluções de tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 6,0, GSH 10 mmol/L e 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) 20 mmol/L.

Durante a leitura foi utilizado 1,250 mL de tampão com pH 6,0, mais 150 µL de GSH, 25 µL de tecido e 75 µL de CDNB. O resultado foi expresso como µmol GS-DNB/min/mg proteína (HABIG; PABST; FLEISCHNER; GATMAITAN *et al.*, 1974).

3.5.5 *Quantificação da vitamina C*

O protocolo desenvolvido por (ROE, 1954) foi aplicado para a estimativa dessa vitamina. Para isso, amostra tecidual (fígado) foi diluída na proporção de 1:15. Foi adicionado a 1 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%, misturados suavemente e centrifugados à 3000 rpm a 4°C por 10 minutos.

Após centrifugação, pipetou-se 100 µL de H_2O , 300 µL de amostra, 100 µL de TCA 13,3% e 75 µL de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) em tubo de ensaio, misturados suavemente e incubados a 37°C por 3 h.

Após incubação foram adicionados 500 µL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 65% aos tubos. A estimativa dessa vitamina foi determinada em espectrofotômetro (absorbância no comprimento de onda 520 nm) e o resultado expresso como µmol ASA/8 tecidos.

3.5.6 *Quantificação do TBARS*

A dosagem de TBARS foi quantificada conforme método descrito por (BUEGE; AUST, 1978). O tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 7,5, e centrifugados a 4.000 rpm, por 15 minutos à 4°C. A seguir foram adicionados 500 µL de TCA a 10%, e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. A mistura foi aquecida em água fervente por 30 minutos e resfriada em banho de gelo por 10 minutos. As amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex.

Após centrifugação a 10.000 rpm, por 15 min à 4°C, as TBARS foram determinadas na absorbância de 535 nm, utilizando-se a curva de malondialdeído (MDA) como padrão. O resultado foi expresso como nmol/MDA/mg proteína.

3.5.7 Quantificação dos níveis de carbonilação de proteínas

A quantificação dos níveis de carbonilação de proteínas foi realizada usando método descrito por (COLOMBO; CLERICI; GARAVAGLIA; GIUSTARINI *et al.*, 2016).

O fígado foi homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS), e posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 10 minuto a 4 °C. Em placa de 96 poços, foram colocados 100 µL de sobrenadante e, em seguida, adicionados 100 µL de solução de DNPH (19,8 mg de DNPH em 10 mL de HCl 2 M). A placa foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro e, em seguida, 50 mL de NaOH 6 M/L (24 g de NaOH em 100 mL de H₂O) foram adicionados.

A leitura foi realizada a 450 nm e o resultado expresso em nmol/carbonil/mg proteína.

3.6 Análise estatística

Os dados estão apresentados como médias $\pm$ erro padrão da média (SEM). Todos os resultados foram submetidos ao teste Shapiro-Wilk para verificação da distribuição Gaussiana. Em seguida foram submetidos à análise estatística através da análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA) seguida de pós-teste de Tukey (teste paramétrico). Quando necessário alguns dados foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (teste não paramétrico).

As análises e gráficos foram realizadas com a utilização do programa estatístico GraphPad Prism, versão 8 (San Diego, CA, USA). O nível de significância considerado para todas as variáveis foi de 95%.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito de curto e longo prazo da desnutrição calórica sobre composição corporal, ingestão alimentar e hídrica

Na figura 1 está apresentada a evolução ponderal e peso corporal dos ratos durante todo o período experimental. Durante o período que antecedeu a restrição alimentar não se observou diferença estatística entre grupos, nem entre sexo ($P>0,05$, Fig. 1A, 1B e 1C).

Durante o tratamento da desnutrição, observou-se redução na evolução ponderal em 35,54%, nos ratos RA50-M comparados ao grupo CONT-M, também foi observada uma redução na evolução ponderal em 21,84% nas ratas RA50-F comparadas ao grupo CONT-F ($P<0,001$, Fig. 1A e 1D). Da mesma forma, a redução se manteve ao término do período de desnutrição, onde se observou redução de 45,27% no peso corporal do grupo RA50-M *versus* CONT-M e redução de 27,57% no peso do grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,001$, Fig. 1B).

Durante o período de recuperação nutricional (período pós-desnutrição), não se observou diferença estatística entre os grupos RA50-M *versus* CONT-M e RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,001$, Fig. 1A e 1E). Da mesma forma, o peso corporal aos 120 dias de vida, não diferiu entre os grupos, em ambos os sexos ($P>0,05$, Fig. 1B).

Ao término do período de desnutrição, comparando-se o efeito entre machos e fêmeas, pode-se observar redução de 22,10% na evolução ponderal e redução de 29,67% no peso corporal do grupo CONT-F *versus* CONT-M ($P<0,001$, Fig. 1A, 1B e 1D). No entanto, neste mesmo período, não se observou diferença estatística entre RA50-M *versus* RA50-F.

Ao término do período pós-desnutrição, comparando-se o efeito de longa duração entre machos e fêmeas nos mesmos grupos, se observou evolução ponderal 38,05% menor e peso corporal 35,28% menor no grupo CONT-F *versus* CONT-M ($P<0,001$, Fig. 1A, 1B e 1E). Já nos grupos submetidos à desnutrição, observou neste mesmo período, redução de 33,00% na evolução ponderal e de 39,95% no peso corporal do grupo RA50-F *versus* RA50-M ($P<0,001$, Fig. 1A, 1B e 1E).

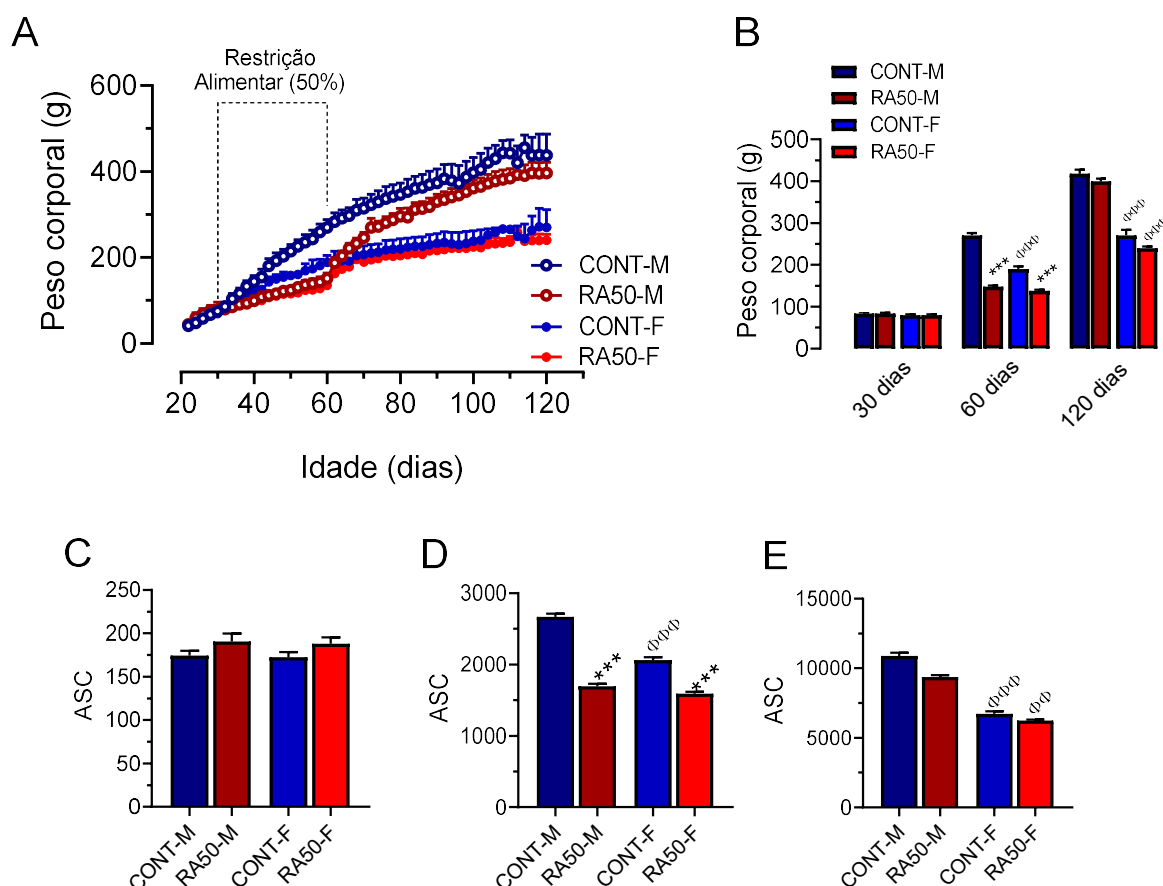


Figura 1. Evolução ponderal (A, C, D e E) e peso ao término de cada período experimental (B). Os dados das figuras (A-E) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 8 ninhadas diferentes. As figuras C, D e E representam a área sob a curva (ASC) durante cada período experimental: antes (C), durante (D) e depois do período da restrição alimentar (E). Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. *** $P < 0,001$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: ΦΦΦ $P < 0,001$, ΦΦ $P < 0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Na figura 2 está apresentada a ingestão alimentar relativa ao peso corporal dos ratos durante todo o período experimental. Durante o período que antecedeu a restrição alimentar, não se observou diferença entre os grupos, nem entre sexos ($P > 0,05$, Fig. 2A e 2B). Neste mesmo período, não foi observada diferença estatística entre machos *versus* fêmeas, em seus respectivos grupos.

Durante o tratamento da desnutrição, observou-se diferença estatística entre os grupos desnutridos em 41,03% no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P < 0,001$, Fig. 2A e 2C) e em 20,04% no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P < 0,01$, Fig. 2A e 2C).

Durante o período pós-desnutrição, foi observado aumento da ingestão alimentar em 27,33% nos ratos RA50-M *versus* CONT-M ($P < 0,001$, Fig. 2A e 2D) e de 32,88% nas ratas

RA50-F *versus* CONT-F ($P < 0,001$, Fig. 2A e 2D). No período pós-desnutrição, também não foi observada diferença estatística entre machos *versus* fêmeas, em seus respectivos grupos.

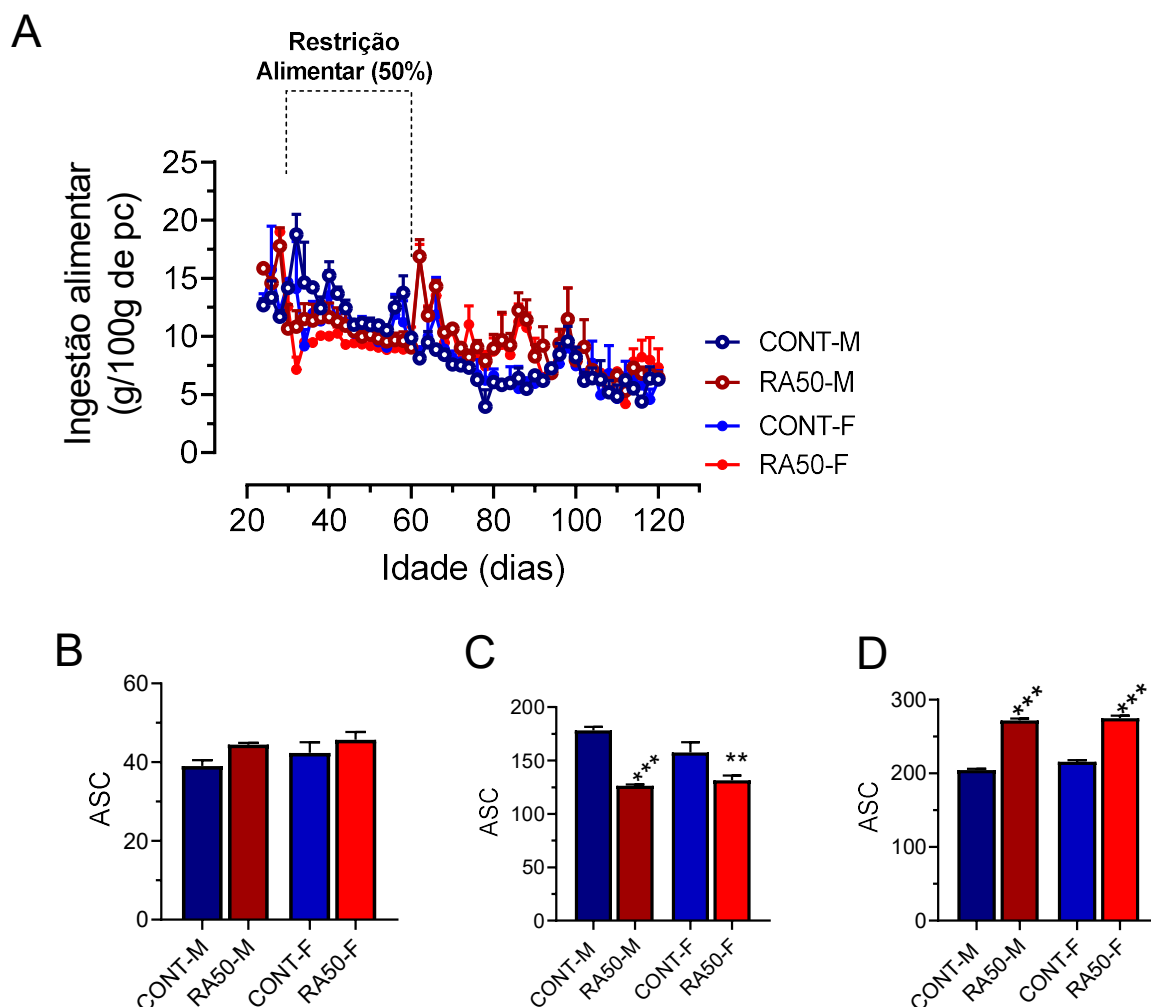


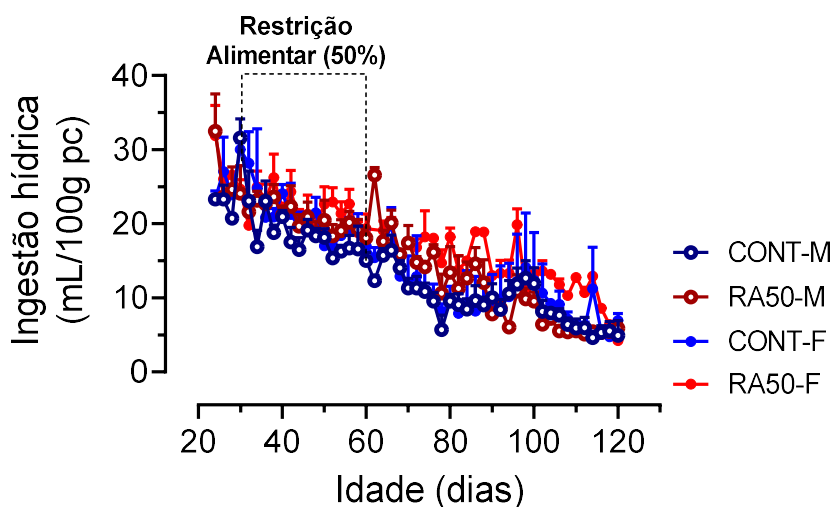
Figura 2. Ingestão alimentar durante cada período experimental. Os dados das figuras (A-D) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 4 ninhadas diferentes. As figuras B, C e D representam a área sob a curva (ASC) durante cada período experimental antes (B), durante (C) e depois do período da restrição alimentar (D). Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. *** $P < 0,001$, RA50 *versus* CONT, $^{\Phi\Phi}$ $P < 0,05$. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Na figura 3 está apresentada a ingestão hídrica relativa ao peso corporal dos ratos durante todo o período experimental. Em ambos os períodos, pré-desnutrição e durante a restrição alimentar, não se observou diferença estatística entre os grupos, nem entre sexos ($P > 0,05$, Fig. 3A, 3B e 3C).

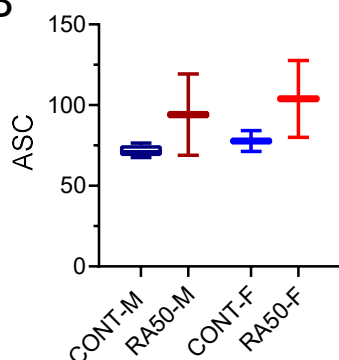
Da mesma forma, durante o período pós-desnutrição, não se observou diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 3A e 3D); porém, comparando-se a ingestão hídrica

entre sexos no grupo desnutrido, se observou aumento de 43,43% na ingestão hídrica do grupo RA50-F *versus* RA50-M ($P < 0,05$, Fig. 3A e 3D).

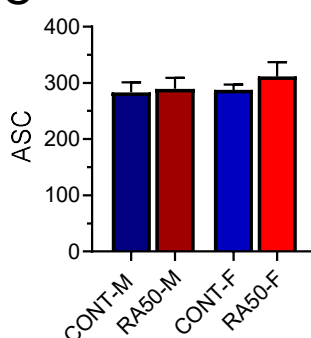
A



B



C



D

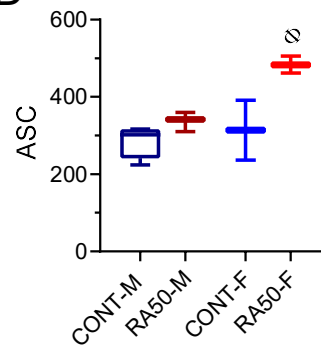


Figura 3. Ingestão hídrica durante cada período experimental. Os dados das figuras (A-D) estão apresentados como média $\pm$ SEM (figuras A e C) e mediana com mínimo e máximo (figuras B e D) de 4 ninhadas diferentes. As figuras B, C e D representam a área sob a curva (ASC) durante cada período experimental antes (B), durante (C) e depois do período da restrição alimentar (D). O símbolo sobre a barra representa diferença estatística entre sexo no grupo RA50, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey.[®] $P < 0,05$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

4.2 Efeito de curto prazo da desnutrição calórica sobre homeostase glicêmica, composição corporal e estado redox

A figura 4 apresenta a homeostase glicêmica dos ratos aos 60 dias de vida (logo após o período de desnutrição). Tanto a glicemia de jejum ($P > 0,05$, Fig. 4A), quanto a glicemia durante o ipGTT ($P > 0,05$, Fig. 4B e 4C) não se observou diferença estatística entre grupo nem entre sexo.

Durante o ipITT, observou-se aumento do valor de Kitt em 86,68% nas fêmeas RA50-

F quando comparadas ao grupo CONT-F; ($P<0,05$, Fig. 4D e 4E). Comparando macho e fêmea, observou-se redução do valor de Kitt em 74,89% no grupo CONT-F, comparado ao grupo CONT-M ($P<0,05$, Fig. 4D e 4E).

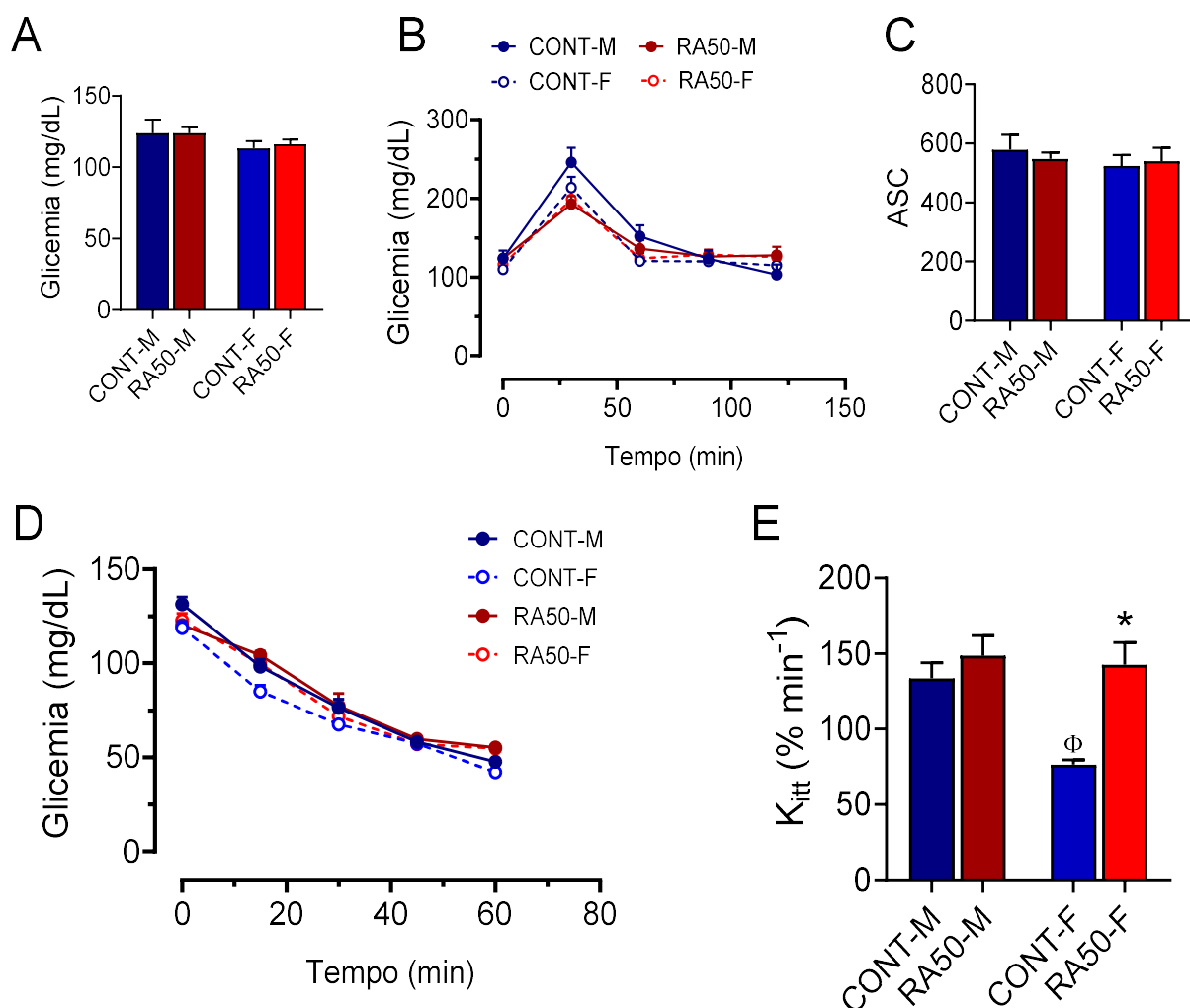


Figura 4. Homeostase glicêmica pós-desnutrição. Os dados das figuras (A-E) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 8 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa a glicemia de jejum, a figura B representa a cura para o ipGTT e a figura C representa a área sob a curva (ASC) durante o ipGTT. A figura D representa a cura para o ipITT e a figura E representa a constante de desaparecimento da glicose (Kitt) durante o ipITT. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey., * $P<0,05$, RA50 versus CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: Φ $P<0,05$, fêmeas versus machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Na figura 5 estão os resultados da composição corporal dos ratos aos 60 dias de vida. Quanto ao peso corporal e o índice de adiposidade, houve redução desses valores em ambos os grupos. O peso corporal foi menor em 43% nos ratos RA50-M comparado ao grupo CONT-M ($P<0,001$, Fig. 5A) e em 21,06% nas ratas RA50-F em comparação ao grupo CONT-F ($P<0,05$,

Fig. 5A). Quanto ao índice de adiposidade, este foi menor em 45,63% nos ratos RA50-M *versus* CONT-M ($P<0,01$, Fig. 5C) e em 54,09% nas ratas RA50-F em comparação ao grupo CONT-F ($P<0,001$, Fig. 5C). Quanto ao comprimento naso-anal, este foi menor em 13,14% nos ratos RA50-M comparado ao CONT-M ($P<0,001$, Fig. 5B).

Porém, comparando-se machos e fêmeas, observou-se redução em 44,17% no peso corporal e em 14,26% no comprimento naso-anal (CNA), no grupo CONT-F comparado ao grupo CONT-M ($P<0,001$, Fig. 5A; $P<0,01$, Fig. 5B). Quanto ao índice de adiposidade observou-se aumento em 40,30% no grupo CONT-F comparado ao grupo CONT-M ($P<0,05$, Fig. 5C).

Em comparação ao índice de massa magra, não foi observada diferença estatística entre os grupos RA50-F *versus* CONT-F e nem entre machos e fêmeas de mesmo grupo ($P>0,05$, Fig. 5D).

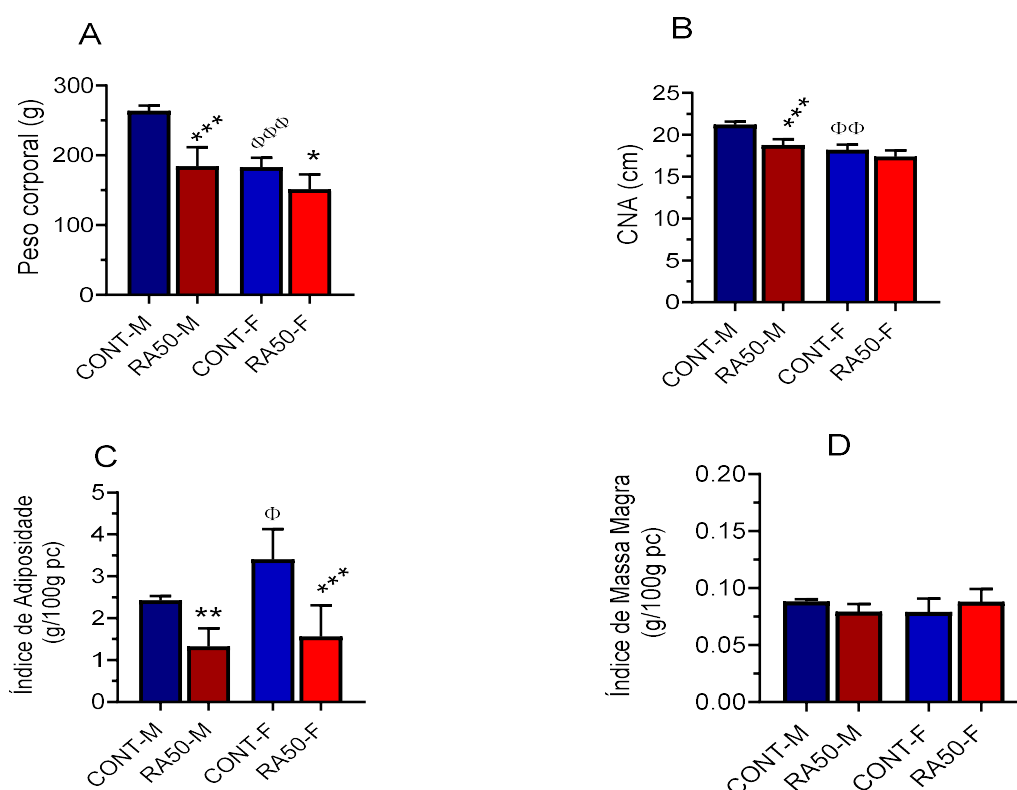


Figura 5. Composição corporal aos 60 dias de vida. Os dados das figuras (A-D) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa o peso corporal, a figura B representa o comprimento naso-anal, a figura C representa o índice de adiposidade e a figura D representa o índice de massa magra. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P<0,05$, *** $P<0,001$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: Φ $P<0,05$, ΦΦ $P<0,01$, ΦΦΦ $P<0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Quanto ao peso relativo do tecido adiposo marrom (TAM), das glândulas adrenal direita e esquerda, não houve diferença estatística entre os grupos RA50-F *versus* CONT-F e RA50-M *versus* CONT-M ($P>0,05$, Fig. 6A, 6C e 6D). Comparando os grupos RA50-M *versus* CONT-M, observou-se redução de 44,64% no valor do tecido adiposo marrom ($P<0,01$; Fig. 6A), porém, o peso relativo do fígado dos ratos RA50-M aumentou em 9,50% em relação ao fígado dos ratos CONT-M ($P<0,05$, Fig. 6B); ao passo que o fígado das ratas RA50-F aumentou em 10,41% em relação ao fígado das ratas CONT-F ($P<0,05$, Fig. 6B).

Por outro lado, comparando-se CONT-F *versus* CONT-M, se observou aumento de 74,42% na glândula adrenal direita ($P<0,001$; Fig. 6C), de 66,27% na glândula adrenal esquerda ($P<0,01$; Fig. 6D). Da mesma forma, comparando-se RA50-F *versus* RA50-M, observou-se aumento de 43,18% na glândula adrenal direita ($P<0,05$; Fig. 6C) e de 45,19% na glândula adrenal esquerda ($P<0,05$; Fig. 6D).

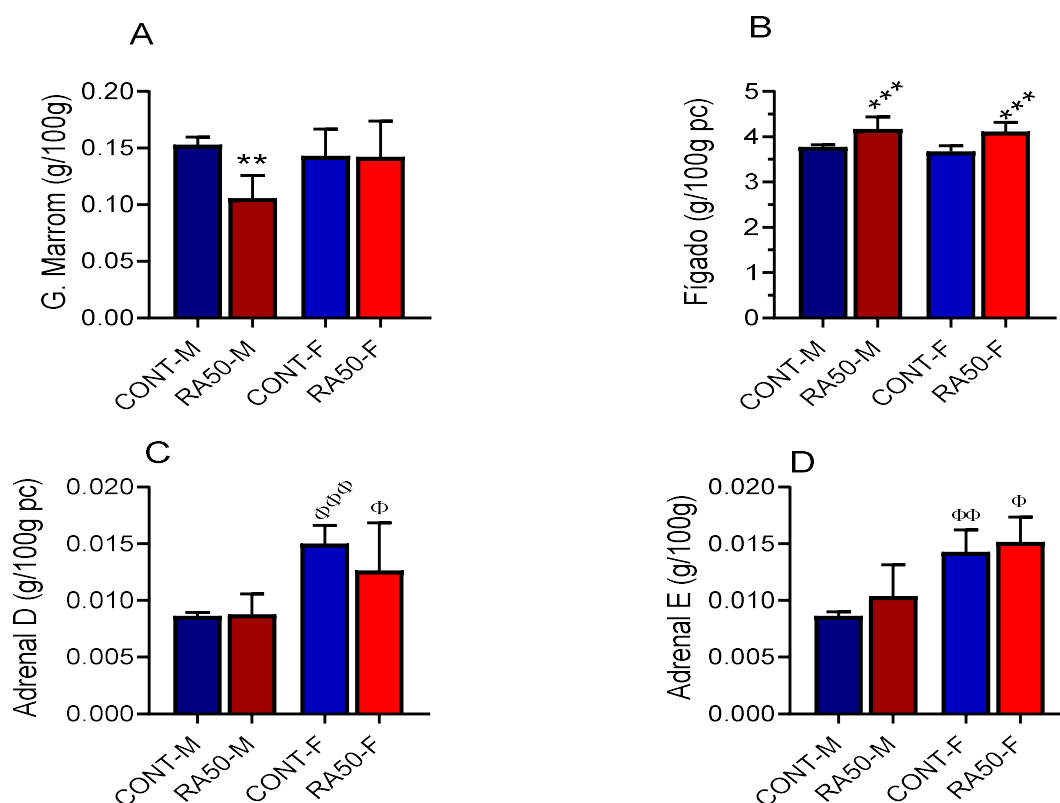


Figura 6. Peso relativo de órgãos aos 60 dias de vida. Os dados das figuras (A-D) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa a gordura marrom, a figura B representa o fígado, a figura C representa a glândula adrenal direita e a figura D representa a glândula adrenal esquerda. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. ** $P<0,05$, *** $P<0,05$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: Φ $P<0,05$, $\Phi\Phi$ $P<0,01$, $\Phi\Phi\Phi$ $P<0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Quanto ao balanço redox hepático, observou-se aumento de 164,77% no nível de GSH do grupo RA50-F em comparação ao CONT-F ($P<0,001$; Fig. 7C). Os demais marcadores avaliados [Super Óxido Desmutase (SOD), Catalase (CAT), vitamina C, carbonil, GST e TBARS] não diferiram entre os grupos RA50-M *versus* CONT-M e RA50-F *versus* CONT-F e nem entre os sexos CONT-M *versus* CONT-F e RA50-M *versus* RA50-F ($P>0,05$; Fig. 7A, 7B, 7D, 7E, 7F e 7G).

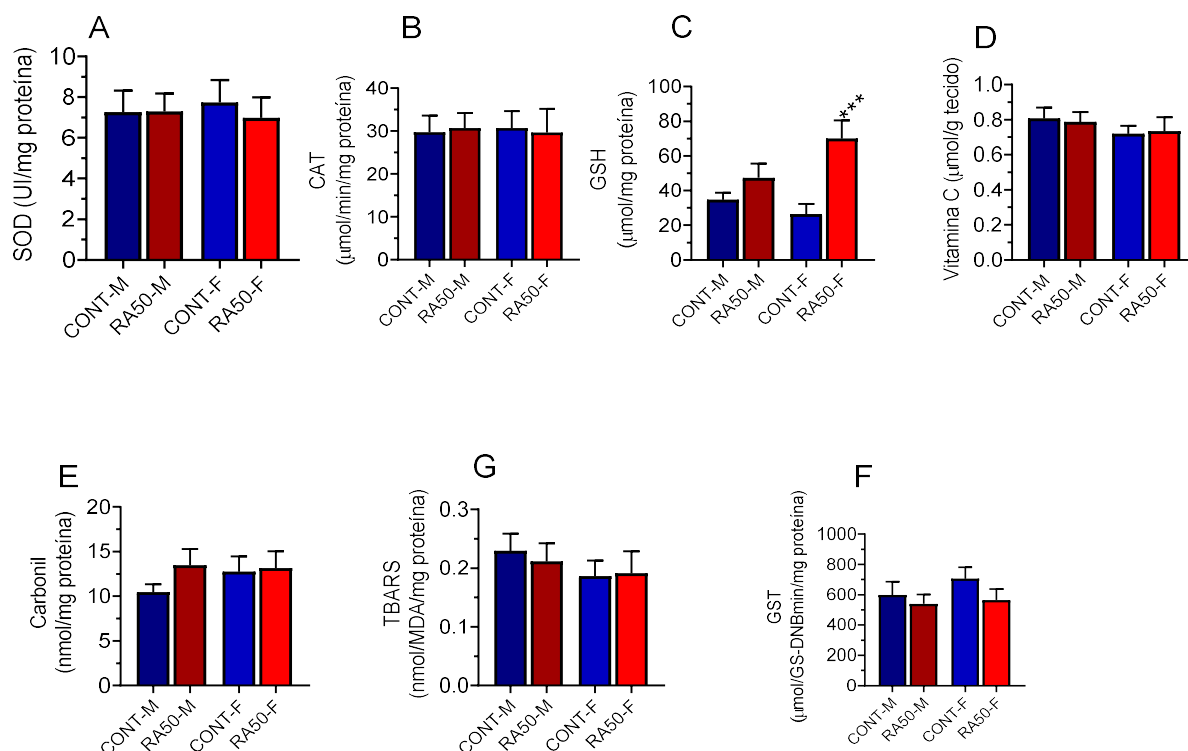


Figura 7. Marcadores do estado redox hepático aos 60 dias de vida. Os dados das figuras (A-F) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa a enzima Super Óxido Desmutase, a figura B representa a catalase, a figura C representa glutatona reduzida, a figura D representa a vitamina C, a figura E representa o carbonil, a figura G representa as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a figura F representa a glutatona-S-transferase. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. *** $P<0,001$, RA50 *versus* CONT. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Quanto ao balanço redox no tecido adiposo marrom na figura 8, em comparação ao grupo CONT-F, o grupo RA50-F apresentou aumento de 51,03% na atividade da SOD ($P<0,001$; Fig. 8A), de 37,26% na atividade da CAT ($P<0,05$; Fig. 8B). Por outro lado, comparando os sexos observou-se redução em 50,59% na atividade da SOD no grupo CONT-F em relação ao grupo CONT-M ($P<0,001$; Fig. 8A), e de 53,78% na atividade da CAT no mesmo grupo ($P<0,05$; Fig. 8B). Quanto aos demais marcadores avaliados (GST, carbonil, GSH

e TBARS) não se observou diferença estatística entre os grupos e nem entre os sexos. Nestes mesmos marcadores avaliados, não foi observada diferença estatística entre machos *versus* fêmeas, em seus respectivos grupos. CONT-M *versus* CONT-F e RA50-M *versus* RA50-F ($P>0,05$; Fig. 8C, 8D, 8E e 8F).

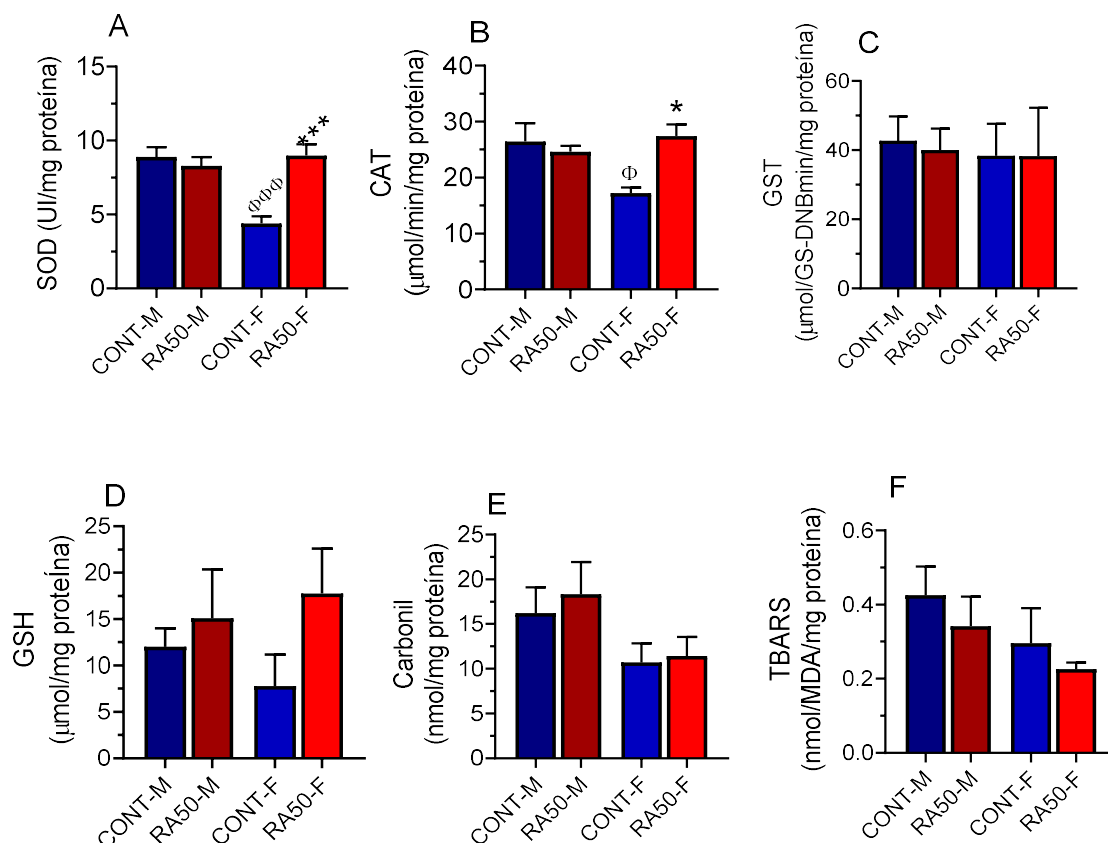


Figura 8. Marcadores antioxidantes no tecido adiposo marrom aos 60 dias de vida. Os dados das figuras (A-F) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa a enzima super óxido dismutase, a figura B representa a catalase, a figura C representa glutathiona reduzida, a figura D representa a vitamina C, a figura E representa o carbonil, a figura G representa as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a figura F representa a glutathiona-S-transferase. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P<0,05$, *** $P<0,001$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: ^Φ $P<0,05$, ^{ΦΦΦ} $P<0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

4.3 Efeito de longo prazo da desnutrição calórica sobre homeostase glicêmica, composição corporal e estado redox

A figura 9 apresenta a homeostase glicêmica dos ratos aos 120 dias de vida. Quanto a glicemia de jejum, observou-se aumento de 11,48% nos ratos RA50-M comparados aos ratos CONT-M ($P<0,05$, Fig. 9A). Porém, não se observou diferença entre RA50-F *versus* CONT-F ($P>0,05$, Fig. 9A), por sua vez o grupo RA50-F apresentou glicemia basal 12,38% menor do

que a glicemia do grupo RA50-M ($P<0,001$, Fig. 9A).

Durante o ipGTT, observou-se redução dos valores glicêmicos em 22,59% nos machos (RA50-M comparado ao grupo CONT-M; $P<0,05$, Fig. 9B e 9C) e em 23,39% nas fêmeas (RA50-F comparado ao grupo CONT-F; $P<0,05$, Fig. 9B e 9C).

Durante o ipITT, observou-se aumento do valor de Kitt em 316% nos machos (RA50-M comparado ao grupo CONT-M; $P<0,001$, Fig. 9D e 9E). Também se observou aumento do valor de Kitt em 130% nas fêmeas (RA50-F comparado ao grupo CONT-F; $P<0,05$, Fig. 9D e 9E).

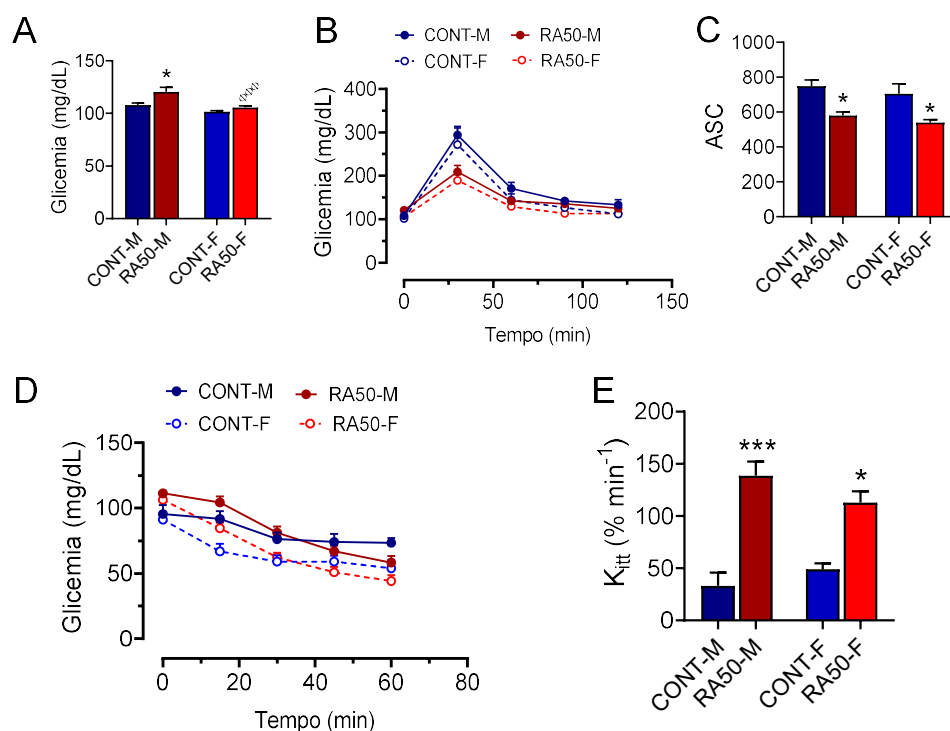


Figura 9. Homeostase glicêmica após recuperação nutricional. Os dados das figuras (A-E) estão apresentados como média ± SEM de 8 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa a glicemia de jejum e a figura C representa a área sob a curva (ASC) durante o ipGTT. A figura E representa a constante de desaparecimento da glicose (Kitt) durante o ipITT. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P<0,05$, *** $P<0,001$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: $\Phi\Phi$ $P<0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Na figura 10 estão os resultados da composição corporal dos ratos aos 120 dias de vida. Quanto ao peso corporal e comprimento naso-anal aos 120 dias de vida, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais (RA50-M *versus* CONT-M e RA50-F *versus* CONT-F; $P>0,05$, Fig. 10A e 10B). Porém, comparando-se machos e fêmeas, houve redução desses valores em ambos os grupos. O peso corporal foi menor em 38,12% nas ratas CONT-F e em 40,14% nas ratas RA50-F em comparação aos respectivos machos do mesmo grupo ($P<0,001$, Fig. 10A). Quanto ao comprimento naso-anal, este foi menor em 15,77% nas ratas CONT-F e

em 14,98% nas ratas RA50-F em comparação aos machos de seus respectivos grupos ($P<0,001$, Fig. 10B).

Quanto ao índice de adiposidade, observou-se aumento de 29,24% no grupo RA50-M comparado ao CONT-M ($P<0,05$, Fig. 10C) e de 37,61% no grupo RA50-F em comparação ao CONT-F ($P<0,01$, Fig. 10C). Não foi observada diferença estatística entre machos e fêmeas de mesmo grupo.

Em comparação ao índice de massa magra do grupo CONT-M, observou-se redução de 18,61% no grupo RA50-M ($P<0,05$, Fig. 10D). Não foi observada diferença estatística entre os grupos RA50-F *versus* CONT-F e nem entre machos e fêmeas de mesmo grupo ($P>0,05$, Fig. 10D).

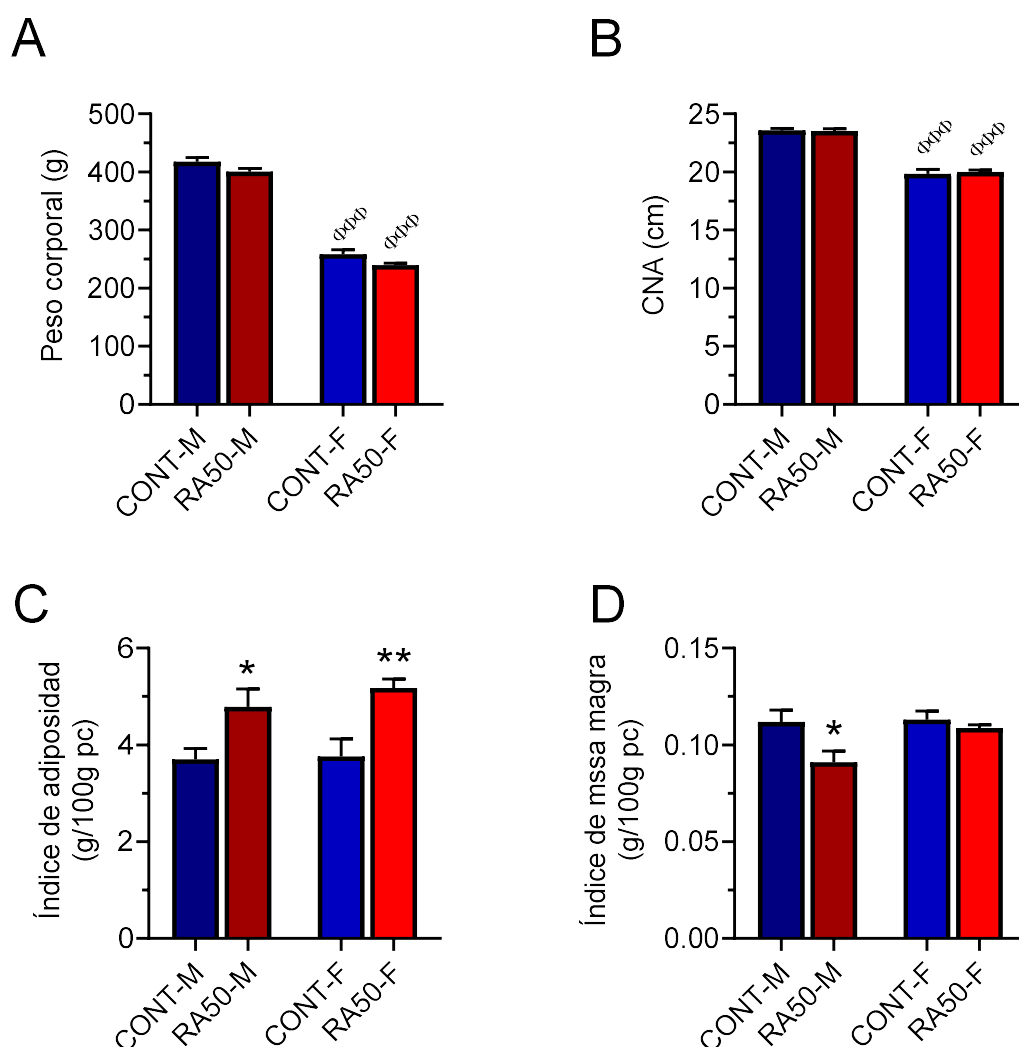


Figura 10. Composição corporal aos 120 dias de vida, após recuperação nutricional. Os dados das figuras (A-D) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 8 ninhadas diferentes. A figura A representa o peso corporal, a figura B representa o comprimento naso-anal, a figura C representa o índice de adiposidade e a figura D representa o índice de massa magra. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: $\Phi\Phi\Phi$ $P<0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho;

CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

O peso relativo do tecido adiposo marrom, glândula adrenal direita e glândula adrenal esquerda, aos 120 dias de vida, não diferiu estatisticamente entre os grupos RA50-M *versus* CONT-M, nem entre os grupos RA50-F *versus* CONT-F ($P>0,05$, Fig. 11A, 11C e 11D). Porém, o peso relativo do fígado dos ratos RA50-M aumentou em 10,34% em relação ao fígado dos ratos CONT-M ($P<0,05$, Fig. 11B); ao passo que fígado das ratas RA50-F aumentou em 13,05% em relação ao fígado das ratas CONT-F ($P<0,05$, Fig. 11B).

Quando se comparou o peso relativo do fígado entre machos e fêmeas, não se observou diferença estatística entre CONT-F *versus* CONT-M e nem entre RA50-F *versus* RA50-M ($P>0,05$; Fig. 11B). Por outro lado, comparando-se CONT-F *versus* CONT-M, se observou aumento de 30,60% no tecido adiposo marrom ($P<0,05$; Fig. 11A), de 95,12% na glândula adrenal direita ($P<0,001$; Fig. 11C) e de 82,72% na glândula adrenal esquerda ($P<0,001$; Fig. 11D). Da mesma forma, comparando-se RA50-F *versus* RA50-M, observou-se aumento de 31,96% no tecido adiposo marrom ($P<0,05$; Fig. 11A), de 131,96% na glândula adrenal direita ($P<0,001$; Fig. 11C) e de 102,42% na glândula adrenal esquerda ($P<0,001$; Fig. 11D).

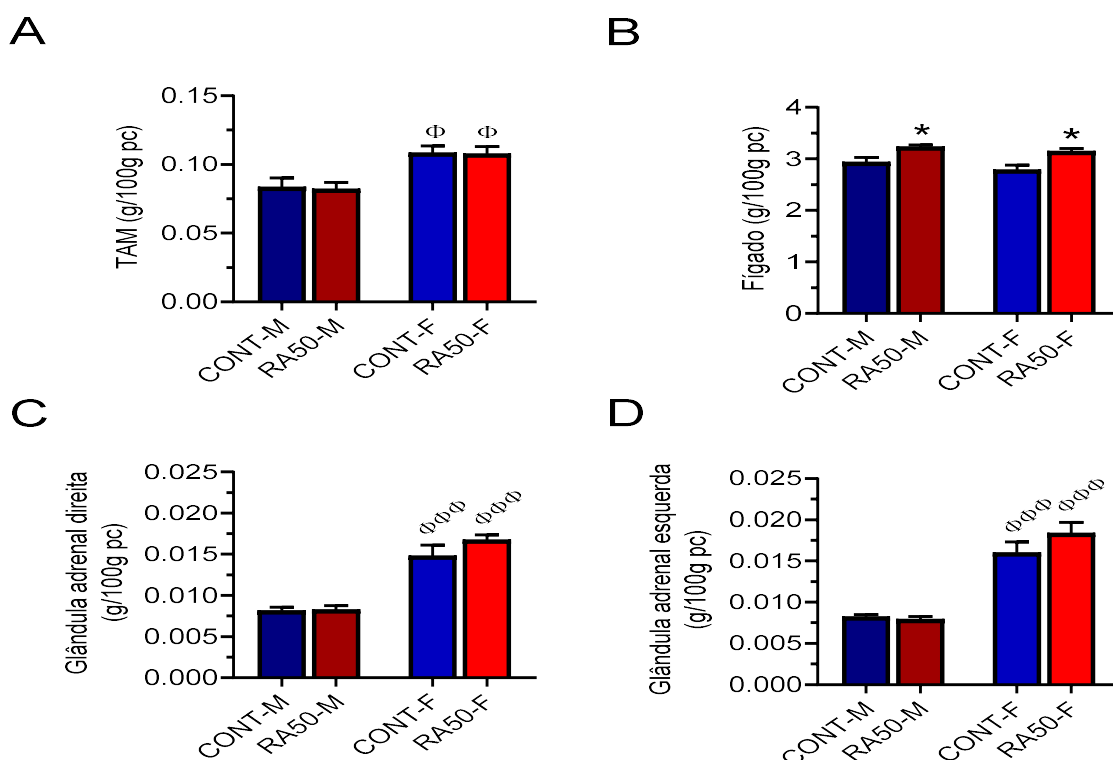


Figura 11. Peso relativo de órgãos aos 120 dias de vida, após recuperação nutricional. Os dados das figuras (A-D) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 8 ninhadas diferentes. A figura A representa

a gordura marrom, a figura B representa o fígado, a figura C representa a glândula adrenal direita e a figura D representa a glândula adrenal esquerda. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P < 0,05$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: $^{\Phi}$ $P < 0,05$, $^{\Phi\Phi\Phi}$ $P < 0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Quanto ao balanço redox hepático, observou-se redução de 27,65% no nível de GSH do grupo RA50-M em comparação ao CONT-M ($P < 0,01$; Fig. 12C). Os demais marcadores avaliados (SOD, CAT, vitamina C, carbonil e TBARS) não diferiram entre os grupos RA50-M *versus* CONT-M e nem entre RA50-F *versus* CONT-F ($P > 0,05$; Fig. 12A, B, D, E e F).

Comparando-se machos *versus* fêmeas dentro de seus respectivos grupos, observou-se que o grupo CONT-F teve aumento de 43,60% na atividade da SOD ($P < 0,05$; Fig. 12A), 56,31% na atividade da CAT ($P < 0,05$; Fig. 12B) e redução de 46,71% nos níveis da GSH ($P < 0,001$; Fig. 12C) em relação ao grupo CONT-M. O nível de vitamina C não diferiu entre CONT-F *versus* CONT-M ($P > 0,05$; Fig. 12D); por outro lado o nível de carbonil aumentou em 184,87% ($P < 0,001$; Fig. 12E) e o de TBARS em 217,92% ($P < 0,01$; Fig. 12F) no grupo CONT-F em comparação ao CONT-M.

Não se observou diferença estatística entre SOD, GSH e vitamina C do grupo RA50-F em relação ao grupo RA50-M ($P > 0,05$; Fig. 12A, C e D). Por outro lado, foi observado aumento de 65,09% na atividade da CAT ($P < 0,05$; Fig. 12B), aumento de 91,99% no nível de carbonil ($P < 0,01$; Fig. 12E) e de 96,67% no nível de TBARS ($P < 0,05$; Fig. 12F) do grupo RA50-F em comparação ao RA50-M.

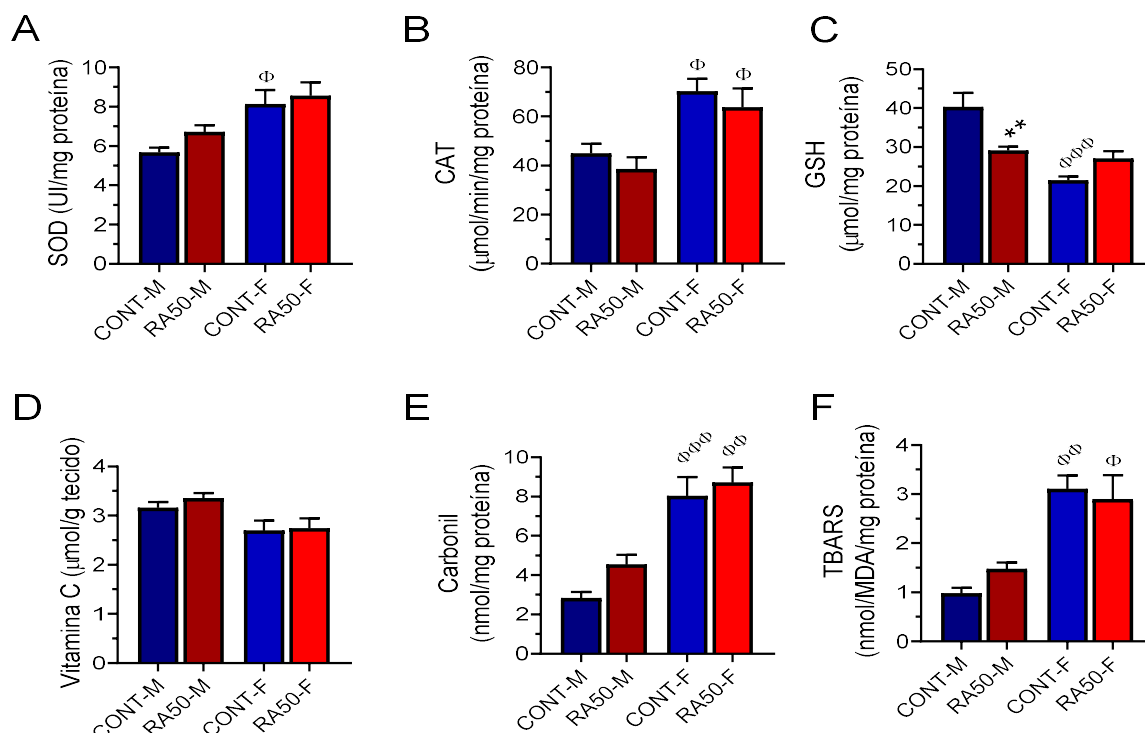


Figura 12. Marcadores do estado redox hepático aos 120 dias de vida, após recuperação nutricional. Os dados das figuras (A-F) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 16 ratos oriundos de 8 ninhadas diferentes. A figura A representa Super Óxido Desmutase, a figura B representa a catalase, a figura C representa glutathiona reduzida, a figura D representa a vitamina C, a figura E representa o carbonil, a figura G representa as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e a figura F representa a glutathiona-S-transferase. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. ** $P < 0,01$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: Φ $P < 0,05$, $\Phi\Phi$ $P < 0,01$, $\Phi\Phi\Phi$ $P < 0,001$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Quanto ao balanço redox no tecido adiposo marrom, em comparação ao grupo CONT-M, o grupo RA50-M apresentou redução de 40,78% na atividade da SOD ($P < 0,001$; Fig. 13A), de 31,42% na atividade da CAT ($P < 0,01$; Fig. 13B) e de 26,65% na atividade da GST ($P < 0,01$; Fig. 13C), sem diferença estatística entre o nível de GSH do grupo RA50-M comparado ao CONT-M ($P > 0,05$; Fig. 13D). Esses mesmos parâmetros não foram estatisticamente diferentes entre os grupos RA50-F e CONT-F.

Comparando-se machos *versus* fêmeas dentro de seus respectivos grupos, observou-se redução de 28,42% na atividade da SOD ($P < 0,05$; Fig. 13A), redução de 23,89% na atividade da CAT ($P < 0,05$; Fig. 13B) e redução de 29,65% na atividade da GST ($P < 0,01$; Fig. 13C) do grupo CONT-F comparado ao CONT-M, sem diferença estatística entre os níveis teciduais de GSH do grupo CONT-F *versus* CONT-M ($P > 0,05$; Fig. 13D). Esses mesmos parâmetros não foram estatisticamente diferentes entre os grupos RA50-F e RA50-M.

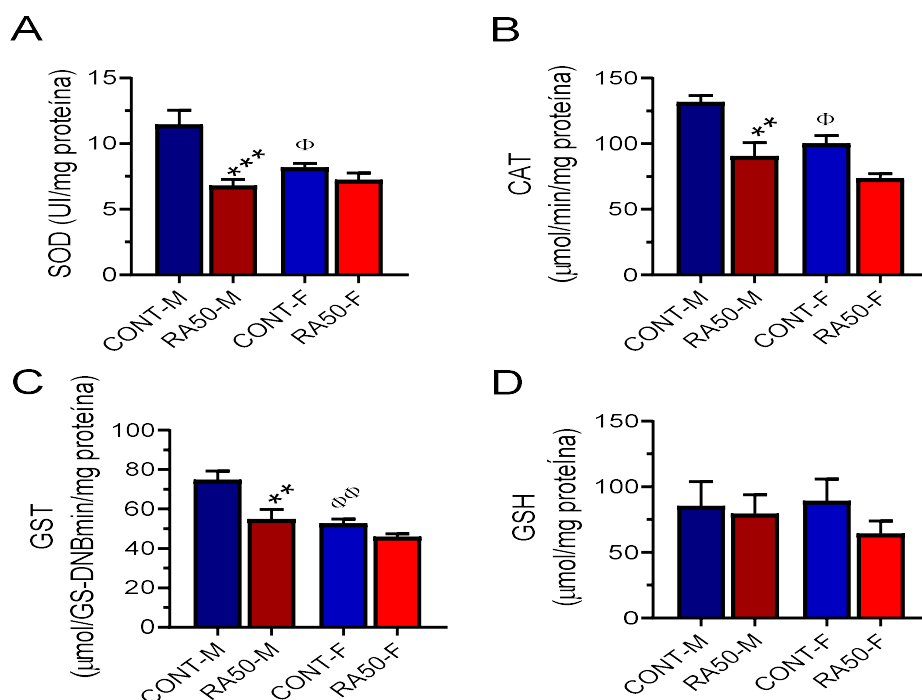


Figura 13. Marcadores antioxidantes no tecido adiposo marrom aos 120 dias de vida. Os dados das figuras (A-D) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 8 ratos oriundos de 8 ninhadas diferentes. A figura A representa Super Óxido Desmutase, a figura B representa a catalase, a figura C representa glutathiona-S-transferase e a figura D representa glutathiona reduzida. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: Φ $P < 0,05$, ΦΦ $P < 0,01$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

4.4 Efeito de curto e longo prazo da desnutrição calórica sobre o perfil lipídico, resistência à insulina e risco cardiovascular.

Quanto à glicose (Fig. 14A), triglicerídeos (Fig. 14B) e índice TyG (Fig. 14C) aos 60 dias e triglicerídeos (Fig. 14E) aos 120 dias não houve diferença estatística entre os grupos experimentais RA50-M *versus* CONT-M e RA50-F *versus* CONT-F e nem entre sexos CONT-M *versus* CONT-F e RA50-M *versus* RA50-F ($P > 0,05$).

Comparando-se os outros grupos, aos 120 dias de idade, se observou aumento no valor da glicose em 13,99% no grupo RA50-F *versus* CONT-F e aumento no valor do índice TyG em 6,36% nos ratos RA50-M *versus* CONT-M ($P < 0,05$; Fig. 14D, e 14F) respectivamente. Por outro lado, comparando-se os sexos, se observou redução em 4,36% no valor do índice TyG de ratos RA50-F *versus* RA50-M aos 120 dias de idade ($P < 0,01$; Fig. 14F).

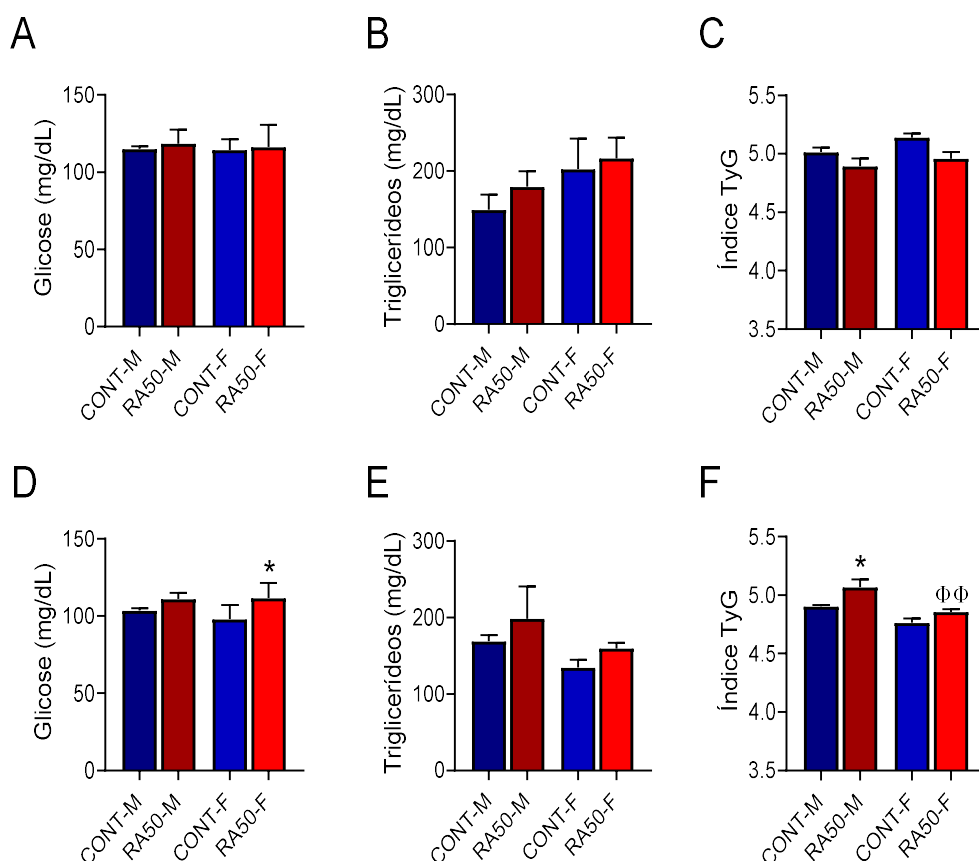


Figura 14. Homeostase glicêmica aos 60 e 120 dias. Os dados das figuras (A-F) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 8 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa a glicose, a figura B representa os triglicerídeos e a figura C representa o índice TyG aos 60 dias e a figura D representa a glicose, a figura E representa os triglicerídeos e a figura F representa o índice TyG aos 120 dias. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P < 0,05$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: $\Phi\Phi$ $P < 0,01$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Quanto ao perfil lipídico, não houve diferença estatística entre os valores de colesterol VLDL (Fig. 15C), colesterol HDL (Fig. 15D) de ratos com 60 dias de idade, independente do sexo e nem no colesterol total (Fig. 15E) de ratos de 120 dias de idade, independente do sexo ($P > 0,05$).

Contudo, aos 60 dias de vida, observou-se aumento de 22,51% no valor de colesterol total no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P < 0,01$; Fig. 15A), aumento em 38,80% no valor de colesterol LDL no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P < 0,01$; Fig. 15B) e aumento de 54,65% no valor de colesterol LDL no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P < 0,01$; Fig. 15B).

Também se observou aumento no valor de colesterol LDL de ratos aos 120 dias de vida, em 48,31% no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P < 0,001$; Fig. 15F) e aumento em 26,73% no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P < 0,01$; Fig. 15F). Quanto ao colesterol HDL de ratos aos 120 dias de vida, se observou redução em 36,12% no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P < 0,05$;

Fig.15H) e redução de 84,17% no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,01$; Fig.15H). Comparando os sexos, observou-se redução de 44,89% no valor de colesterol VLDL, no grupo RA50-F *versus* RA50-M, aos 120 dias de vida ($P<0,05$; Fig.15G).

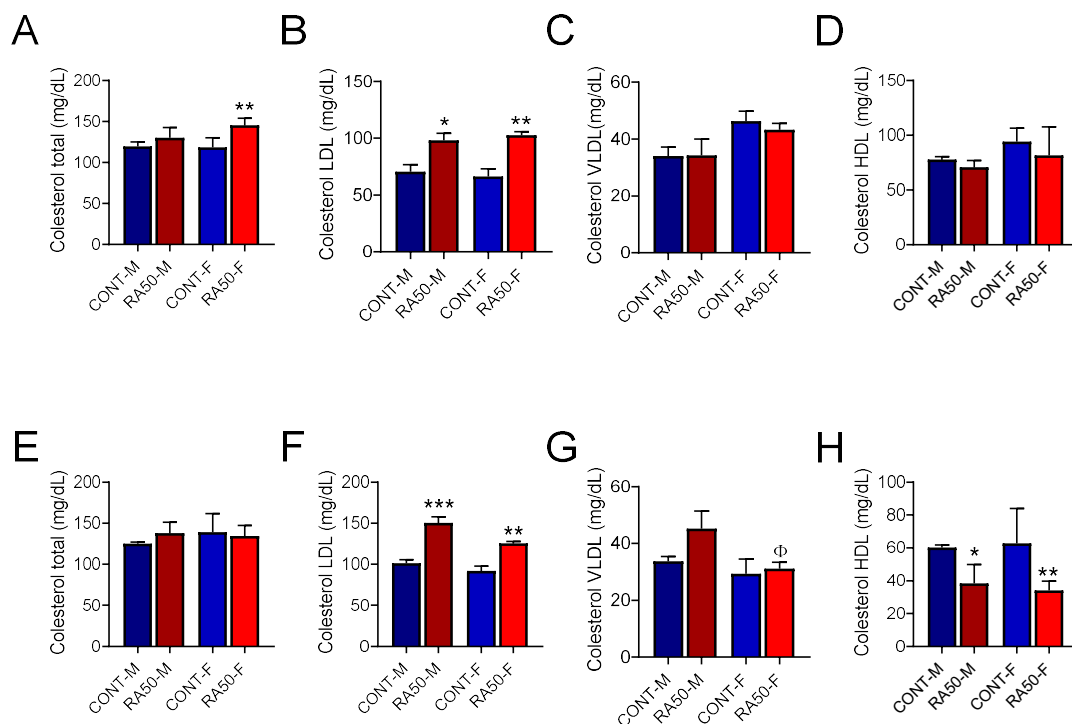


Figura 15. Perfil lipídico aos 60 e 120 dias. Os dados das figuras (A-H) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 8 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa o colesterol total, a figura B representa o colesterol LDL, a figura C representa o colesterol VLDL e a figura D representa o colesterol HDL aos 60 dias e a figura E representa o colesterol total, a figura F representa o colesterol LDL, a figura G representa o colesterol VLDL e a figura H representa o colesterol HDL aos 120 dias. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, *** $P<0,01$, RA50 *versus* CONT; e entre os sexos dentro de cada grupo: ϕ $P<0,05$, fêmeas *versus* machos. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

Comparando-se os grupos experimentais aos 60 dias, não houve diferença estatística entre os valores do índice Castelli I nos diferentes grupos experimentais, independente do sexo ($P>0,05$; Fig.16A); por outro lado, observou-se aumento de 43,88% no valor do índice Castelli II no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P<0,05$; Fig.16B). Também se observou um aumento em 43,74% na relação triglicerídeos/HDL no grupo desnutrido macho (RA50-M) comparando ao grupo controle macho (CONT-M) ($P<0,05$; Fig.16C).

Na comparação dos ratos aos 120 dias de vida, observou-se aumento de 92,71% no valor do índice Castelli I no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P<0,05$; Fig.16D) e aumento de 88,43% no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,05$; Fig.16D). Também se observou aumento em 101,72% no valor do índice Castelli II no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P<0,05$;

Fig.16E) e aumento em 118,49% no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,01$; Fig.16E). Na relação triglicerídeos/HDL se observou aumento em 101,78% no grupo RA50-M *versus* CONT-M ($P<0,01$; Fig.16F), e aumento em 116,40% no grupo RA50-F *versus* CONT-F ($P<0,05$; Fig.16F).

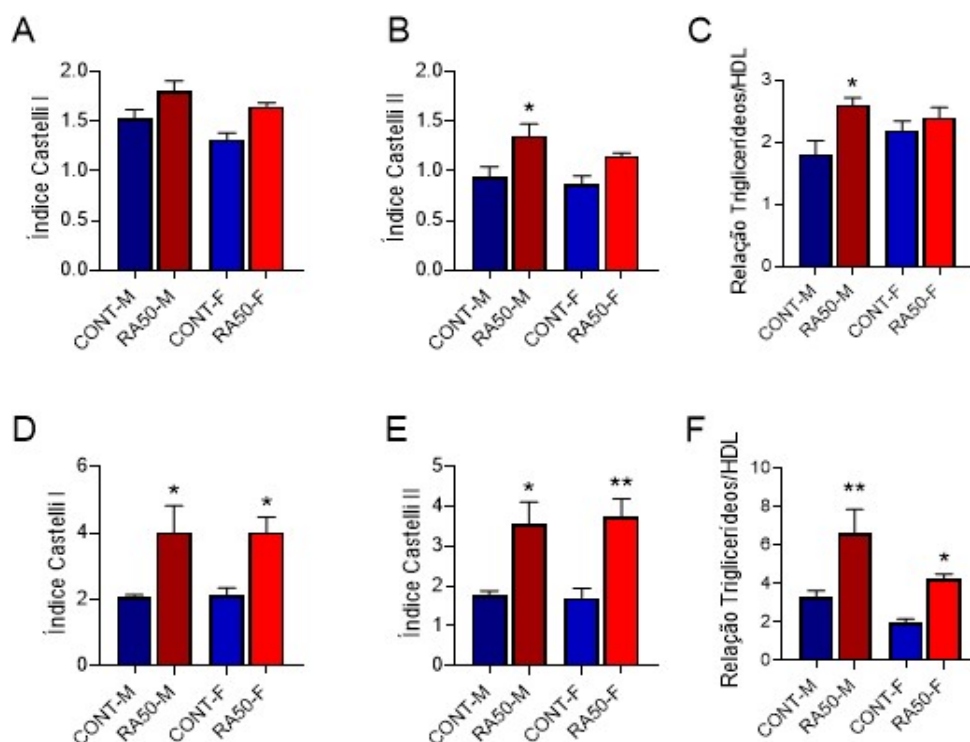


Figura 16. Índice Castelli I e II aos 60 e 120 dias. Os dados das figuras (A-F) estão apresentados como média $\pm$ SEM de 8 ratos oriundos de 4 ninhadas diferentes. A figura A representa o índice Castelli I, a figura B representa Castelli II, a figura C representa a relação triglicerídeos aos 60 dias e a figura D representa o índice Castelli I, a figura E representa o índice Castelli II e a figura F representa a relação triglicerídeos aos 120 dias. Os símbolos sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, a partir do teste *one-way* ANOVA seguido do teste de Tukey. * $P<0,05$, ** $P<0,01$, RA50 *versus* CONT. CONT-M, grupo controle macho; CONT-F, grupo controle fêmea; RA50-M, grupo submetido a restrição alimentar macho; RA50-F, grupo submetido a restrição alimentar fêmea.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho, mostramos o efeito de curto e longo de prazo da desnutrição calórica em ratos Wistar, fazendo um comparativo direto entre fêmeas e machos.

Quanto ao aumento de adiposidade observado como efeito de longo prazo em ratos que foram desnutridos na adolescência, é possível que durante este período tenha havido alterações em fatores de transcrição gênica envolvidos na regulação do metabolismo energético. No período da restrição calórica, o fato de os animais não ingerirem a quantidade adequada de nutrientes os levou a perda de peso, o que possivelmente desencadeou o estímulo de fome crônica e consequentemente isso pode ter modulado alterações endócrinas. Durante o jejum, a grelina aumenta como resposta à redução da ingestão alimentar, enquanto a leptina diminui como resposta à perda de tecido adiposo, levando a um aumento do apetite, através da estimulação dos neurônios NPY/AgRP hipotalâmicos, e a um aumento da secreção de hormônio do crescimento (GH). Apesar deste aumento do GH, a produção hepática e os níveis séricos de IGF-1 diminuem durante o jejum devido ao desenvolvimento de resistência hepática ao GH (WON; BORSKI, 2013). Neste estágio de fome crônica, há também redução da fosforilação e a acetilação de STAT (YAMAMOTO; IGUCHI; FUKUOKA; SUDA *et al.*, 2013), aumento da produção de FGF-21 (CONTRERAS; TORRES; TOVAR, 2013) e diminuição do IGF-1 (BREIER, 1999), bem como aumento da atividade da SIRT-1, levando à desacetilação e inativação da STAT3, e desacetilação e degradação do SREBP-1, reduzindo a lipogênese e a síntese de colesterol (CHALKIADAKI; GUARENTE, 2012).

Ao longo do período de recuperação nutricional, onde os animais voltaram a receber quantidades *ad libitum* de ração, como esperado se observou maior ingestão alimentar em ambos os sexos, pois neste estágio os ratos que foram submetidos à desnutrição têm o metabolismo alterado devido ao período da desnutrição. Assim, eles tendem a comer mais e consequentemente ganhar mais peso, como efeito fisiológico para tentar recuperar a carência calórica (DE WIT; SAS; WIT; CUTFIELD, 2013). Contudo muitas vezes quando o efeito da desnutrição afeta de forma mais fatores de transcrição gênica, isso pode ocasionar uma recuperação tardia, o que pode contribuir para o desenvolvimento de obesidade em longo prazo.

Dentre outras possibilidades de explicação, durante o período de livre oferta alimentar, imediatamente após a desnutrição, o “*catch up*” resulta de duas ações aparentemente conflituosas associadas à ação do GH e da grelina (WON; BORSKI, 2013), já que neste período a resistência hepática ao GH termina e os níveis elevados de GH resultam em níveis elevados de IGF-1 que atuam nos tecidos alvo para promover síntese proteica e divisão celular superiores ao normal, levando a um “*catch up*”. Gradualmente, a produção de leptina aumenta à medida

que as reservas adiposas aumentam, o que leva a uma maior inibição da produção central de GH. Ao mesmo tempo, a secreção de grelina cai e diminui ainda mais a secreção de GH (WON; BORSKI, 2013).

Dados derivados de estudos clínicos relacionando obesidade e estresse oxidativo, estabeleceram uma correlação entre biomarcadores de estresse oxidativo com altos índices de massa corporal (SANKHLA; SHARMA; MATHUR; RATHOR *et al.*, 2012; VINCENT; TAYLOR, 2006). Diferentemente do que foi visto em ratos machos submetidos a desnutrição proteica durante a adolescência (DE OLIVEIRA; DE MOURA; MIRANDA; DE MORAES *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA; LISBOA; DE MOURA; BARELLA *et al.*, 2013), no presente trabalho não se observou intolerância à glicose e resistência à insulina. Como já vem sendo mostrado na literatura, a desnutrição é definida por uma inadequada ingestão de nutrientes como proteínas, vitaminas e minerais (DE ONIS; MONTEIRO; AKRE; GLUGSTON, 1993), resultando na incapacidade do organismo em suprir a demanda necessária para o crescimento, desenvolvimento e manutenção de funções específicas de forma fisiológica, aumentando assim a predisposição ao aparecimento e/ou progressão de doenças metabólicas (DE ONIS; MONTEIRO; AKRE; GLUGSTON, 1993), induzindo efeitos diversos ao longo da vida (RIBEIRO; SANTOS-SILVA; VETTORAZZI; COTRIM *et al.*, 2012).

Nossos resultados mostram que os animais que foram desnutridos apresentaram uma maior tolerância à glicose, bem como maior sensibilidade periférica à inulina, em ambos os sexos, apesar dos machos terem hiperglicemia de jejum para o grupo de 120 dias. Quanto ao grupo de animais de 60 dias, foi observado uma maior sensibilidade periférica à inulina nas ratas desnutridas. Isso mostra que os ratos que foram desnutridos têm uma alta sensibilidade periférica à insulina, fato que sugere a hipótese de haver uma participação dos hormônios contra-regulatórios de ação rápida (glucagon e/ou adrenalina) sobre o controle da homeostase glicêmica nesse modelo animal de desnutrição. Estudos mostram que camundongos *Swiss*, tratados por 8 semanas com dieta hipoproteica apresentam uma maior produção de glicogênio hepático, o que vem sendo associado com o aumento da sensibilidade hepática à insulina (MARROQUI; BATISTA; GONZALEZ; VIEIRA *et al.*, 2012).

Os resultados obtidos no presente estudo mostram que a desnutrição foi capaz de modular o sistema antioxidante no tecido adiposo marrom, sem provocar grandes efeitos no fígado. Nossos dados mostram uma redução nas atividades de SOD, CAT e GST no tecido adiposo marrom de ratos machos e uma redução nas atividades de SOD e CAT no tecido adiposo marrom de ratas controle, sugerindo danos oxidativos ao sistema termogênico de ratos machos e fêmeas nos grupos de 120 e 60 dias respectivamente. O desequilíbrio entre a formação

e a remoção das espécies reativas do oxigênio no organismo, decorrente da diminuição dos antioxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, gera um estado pró-oxidante que favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares, que podem resultar na morte e disfunção celular (HALLIWELL, 2012; SIES, 1991).

A SOD é a primeira enzima de desintoxicação e o antioxidante mais poderoso da célula (FRIDOVICH, 1995), sua diminuição pode estar associada a uma produção excessiva de ânion superóxido, que resulta na formação de outras espécies reativas, incluindo o peroxinitrito e o radical hidroxila, potentes indutores de danos ao DNA, proteínas e lipídeos (EVANS; GOLDFINE; MADDUX; GRODSKY, 2002). Por outro lado, ao não se observar redução desses marcadores em fêmeas desnutridas, pode-se inferir que as fêmeas que foram desnutridas, tanto aos 60 quanto aos 120 dias de vida desenvolveram adaptação ao estresse oxidativo gerado pela condição de desnutrição, porque foram observadas aumento nas defesas antioxidantes. Essa adaptação foi dada pelo estrogênio que atua diretamente como um antioxidante contra o radical livre (SANTANAM; SHERN-BREWER; MCCLATCHEY; CASTELLANO *et al.*, 1998).

Como efeito de curto e longo prazo decorrente da desnutrição, observou-se hepatomegalia em ambos os sexos, o que pode estar associado à programação de maior funcionalidade bioquímica do fígado devido aos efeitos do estresse metabólico ocorrido durante a desnutrição frente à carência de reservas energéticas e aumento da lipólise (KHOURY; ZOHAR; SHEHADEH; SAADI, 2018; LEE; CHOI; SCAFIDI; WOLFGANG, 2016). Não foram observadas diferenças nos demais órgãos analisados no grupo 120 dias (tecido adiposo marrom e glândulas adrenais) associadas à desnutrição, contudo se observou dimorfismo sexual, independente da oferta alimentar durante a adolescência. Porém a única diferença que tem no grupo 60 dias, é a redução no peso de tecido adiposo marrom, o que provavelmente explica o fato de que esses animais não usaram a gordura marrom para gerar ATP.

A glândula adrenal, órgão endócrino bilateral que consiste no córtex e na medula, tem diferentes funções endócrinas e origens de desenvolvimento (YATES; KATUGAMPOLA; CAVLAN; COGGER *et al.*, 2013). O córtex adrenal sintetiza hormônios esteróides a partir do colesterol através de uma série de vias metabólicas; por sua vez, a medula produz epinefrina e norepinefrina como parte do sistema nervoso simpático. O córtex se desenvolve a partir do tecido mesodérmico, enquanto a medula se origina do neuroectoderma (PIHLAJOKI; DORNER; COCHRAN; HEIKINHEIMO *et al.*, 2015; ROSS; LOUW, 2015). Quando as glândulas estão submetidas ao estresse, como foi o caso desse trabalho que gerou o insulto associado a desnutrição, ao perceber o estresse, a amígdala ativa o eixo HPA, sinalizando ao hipotálamo para liberar o hormônio liberador de corticotropina (CRH), o qual desencadeia a

liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise anterior, que estimula a liberação de cortisol pelo córtex adrenal (EHLERT; GAAB; HEINRICHS, 2001; JANKORD; HERMAN, 2008).

Níveis aumentados de cortisol mobilizam glicose e substratos teciduais como combustível, suprimem sistemas de órgãos não vitais para permitir o gerenciamento eficaz do estresse (HEIM; EHLERT; HELLHAMMER, 2000). Como efeito de curto prazo da desnutrição no tecido adiposo marrom foi observado uma redução no peso deste tecido.

É bom relatar também que o tecido adiposo marrom é importante para a resposta termogênica e balanço energético em pequenos mamíferos, tendo como função principal oxidar lipídios para produzir calor, portanto, é especializado na termogênese adaptativa (HIMMS-HAGEN, 1990). A dieta também pode ativar o tecido adiposo marrom de maneira semelhante (termogênese induzida pela dieta), esta atividade influencia o comportamento alimentar e o equilíbrio de energia, consequentemente ratos transgênicos carentes de tecido adiposo marrom desenvolvem obesidade (CINTI, 2006). Foram publicados vários estudos em modelos animais mostrando que a obesidade está relacionada a uma menor atividade do tecido adiposo marrom. Entre esses modelos podemos citar aqueles com alteração gênica como os ratos *fa/fa* (CHUA; CHUNG; WU-PENG; ZHANG *et al.*, 1996; PHILLIPS; LIU; HAMMOND; DUGAN *et al.*, 1996), camundongos *db/db* (ROMSOS, 1981; TSCHOP; HEIMAN, 2002) e animais com obesidade induzida por glutamato monossódico (MORRIS; TORTELLI; FILIPPIS; PROIETTO, 1998; NAGATA; SUZUKI; IIZUKA; TABUCHI *et al.*, 2006).

Em relação ao baixo peso do músculo sóleo em machos, sugere-se que a desnutrição na adolescência, atua como um fator de desequilíbrio, ocasionando alterações nos tecidos e estruturas dos órgãos. O tecido muscular esquelético, é sensível à desnutrição proteica por ser um reservatório de proteína no organismo. Portanto, quando há déficit proteico na dieta, este tecido torna-se alvo de depleção (IHEMELANDU, 1985). No presente estudo, o resultado corrobora com um estudo prévio em que se mostrou que a desnutrição protéica reduziu o peso do tecido muscular (ROWE, 1968), o que provavelmente pode ter ocorrido devido à perda de proteínas teciduais. No nosso trabalho, como efeito de longo prazo da desnutrição calórica, não se observou redução de massa magra em fêmeas, porém houve redução de massa magra em machos. Isso pode ser devido a presença dos hormônios sexuais (estrogênios) nas fêmeas, que servem como proteção na regulação do peso corporal e no gasto energético (SANTANAM; SHERN-BREWER; MCCLATCHEY; CASTELLANO *et al.*, 1998).

Como efeito de curto e longo prazo da desnutrição no perfil lipídico, é bom destacar que ela afeta o equilíbrio lipídico. Neste estudo, observamos um aumento no valor do índice TyG,

aumento no valor da glicose, aumento no valor de colesterol total, aumento no valor de colesterol LDL, redução no valor de colesterol HDL, aumento no índice Castelli I e II nos ratos desnutridos.

Baseado em níveis de triglicerídeos e glicemia em jejum, o índice TyG é outro parâmetro que capaz de identificar componentes da síndrome metabólica, em especial a resistência à insulina em indivíduos com alto risco de doenças cardiometabólicas (YU; WANG; ZHANG; MING *et al.*, 2019). Vários mecanismos possíveis podem explicar o impacto do índice TyG no desenvolvimento da síndrome metabólica. Foi demonstrado que um índice TyG alto está associado a um risco aumentado de eventos cardíacos e cerebrovasculares adversos importantes em paciente metabolicamente não saudável, bem como associado a um maior risco de rigidez arterial e dano microvascular néfrico (DA SILVA; CALDAS; HERMSDORFF; BERSCH-FERREIRA *et al.*, 2019; LUO; WANG; YAN; QIAO *et al.*, 2019; ZHAO; YU; CHI; FAN *et al.*, 2019).

O colesterol é o esteroide mais abundante presente no organismo, sendo uma importante fonte de energia e o principal componente das membranas celulares, além de atuar como precursor dos sais biliares e hormônios esteroides endógenos e realizar o transporte de vitaminas e minerais. Quando alguma desordem metabólica provoca alterações nas concentrações de lipoproteínas, instala-se um quadro chamado de dislipidemia, um distúrbio que modifica o metabolismo dos lipídeos e eleva seus níveis séricos, sendo um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (XAVIER; IZAR; FARIA NETO; ASSAD *et al.*, 2013). Nesse contexto, o colesterol total sérico elevado é considerado por muitos como a principal causa da aterosclerose coronariana, e está bem estabelecido que ele está associado a um risco aumentado de doenças cardiovasculares (STAMLER; DAVIGLUS; GARSIDE; DYER *et al.*, 2000). Então, no caso das ratas fêmeas que foram desnutridas, no presente estudo, elas apresentam aumento no valor de colesterol total, de acordo com estudos de literaturas, elas têm risco de apresentar doenças cardiovasculares.

Em relação ao aumento no valor de colesterol LDL, ele é uma lipoproteína de baixa densidade, produzida principalmente na circulação pela VLDL, e possivelmente da degradação dos quilomícrons. São classificadas como colesterol ruim, pois quando em excesso se acumulam na parede arterial, induzindo a arteriosclerose (XAVIER; IZAR; FARIA NETO; ASSAD *et al.*, 2013). O colesterol LDL foi identificado como o principal fator de risco para doenças cardiovasculares por muitos estudos epidemiológicos e intervencionistas porque o colesterol LDL desempenha um papel importante na patogênese da aterosclerose (STEINBERG, 2009).

Por outro lado, o colesterol HDL é uma lipoproteína de alta densidade, sintetizada no fígado, intestino e circulação, considerado como colesterol bom, pois retira a gordura presente no tecido periférico e transporta para o fígado. O colesterol HDL também atua de forma benéfica na proteção da artéria contra a aterogênese, removendo o colesterol LDL oxidado, inibe a adesão de monócitos e células de adesão ao endotélio e a liberação de óxidos nítricos (XAVIER; IZAR; FARIA NETO; ASSAD *et al.*, 2013). O aumento da colesterol HDL, além de reduzir o risco de doenças cardiovasculares (ASSMANN; SCHULTE, 1992; BARTER; GOTTO; LAROSA; MARONI *et al.*, 2007) também pode inibir a progressão ou até mesmo provocar a regressão da placa aterosclerótica (INEU; MANENTI; DA COSTA; MORIGUCHI, 2006).

Neste trabalho, o resultado do colesterol HDL nos animais após desnutrição se mostrou reduzido. Portanto, altas concentrações plasmáticas de colesterol LDL e baixos níveis do HDL são fatores de risco para doenças cardiovasculares (NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM EXPERT PANEL ON DETECTION; TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN, 2002). Então, os ratos, machos e fêmeas, que foram desnutridos apresentam fatores de risco para doenças cardiovasculares. O índice de risco de Castelli I foi determinado através da relação CT/colesterol HDL, refletindo o risco aterogênico relacionado ao colesterol, característico da síndrome metabólica (VARGAS; NUNES; BARBOSA; VARGAS *et al.*, 2014), o que pode ser confirmado através dos valores do índice Castelli I e II. Estes índices, embora menos citados ultimamente, têm sido confirmado como um melhor preditor de risco cardiovascular (GAO; WEN; OU; ZHANG, 2022; RIVERA-MANCIA; COLIN-RAMIREZ; CARTAS-ROSADO; INFANTE *et al.*, 2018). A relação triglicéridos/HDL é um fator importante para a saúde cardiovascular, pois indica se existe ou não risco de desenvolver doenças cardiovasculares. Só existe risco de doença cardiovascular se houver alterações nestes lípidos. Por exemplo, um aumento na relação trig/hdl (TOUBOUL; VICAUT; LABREUCHE; ACEVEDO *et al.*, 2011). Neste contexto, tendo em conta os resultados, verificou-se um aumento na relação trig/hdl nos ratos desnutridos aos 60 e 120 dias. Este resultado mostra que estes ratos têm um maior risco de desenvolver doenças cardiovasculares.

Considerando o alto nível do índice Castelli I, II e a relação triglicerídeos/HDL em ratos desnutridos machos e fêmeas, deixa entender que esses ratos apresentam um alto nível de risco cardiovascular.

6 CONCLUSÃO

A desnutrição no período da adolescência foi capaz de programar, maior adiposidade visceral, hipersensibilidade periférica à insulina e maior fatores de risco para doenças cardiovasculares, tanto em machos quanto em fêmeas. Também se conclui que a desnutrição na adolescência foi capaz de induzir menor proteção redox no tecido termogênico em ratos machos.

Por outro lado, pode-se perceber que as fêmeas, independente do estresse nutricional apresentaram aumento das defesas contra espécies reativas de oxigênio.

Em análise ao conjunto de resultados apresentados nesse trabalho, é válido comentar que a maneira como o metabolismo reage a uma restrição calórica (fome crônica) mostra que qualquer forma de desnutrição deve ser evitada, não só nos adolescentes, mas nas pessoas em geral, pois quando em fase crítica do desenvolvimento o resultado da desnutrição pode ser surpreendente e devastador.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AASETH, J.; ELLEFSEN, S.; ALEHAGEN, U.; SUNDFOR, T. M. *et al.* Diets and drugs for weight loss and health in obesity - An update. **Biomed Pharmacother**, 140, p. 111789, Aug 2021.

ALBERTI, K. G.; ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. *et al.* Harmonizing the metabolic syndrome: a joint interim statement of the International Diabetes Federation Task Force on Epidemiology and Prevention; National Heart, Lung, and Blood Institute; American Heart Association; World Heart Federation; International Atherosclerosis Society; and International Association for the Study of Obesity. **Circulation**, 120, n. 16, p. 1640-1645, Oct 20 2009.

ALPINO, T. M. A.; SANTOS, C. R. B.; BARROS, D. C.; FREITAS, C. M. COVID-19 and food and nutritional (in)security: action by the Brazilian Federal Government during the pandemic, with budget cuts and institutional dismantlement. **Cad Saude Publica**, 36, n. 8, p. e00161320, Sep 2 2020.

APRIDONIDZE, T.; ESSAH, P. A.; IUORNO, M. J.; NESTLER, J. E. Prevalence and characteristics of the metabolic syndrome in women with polycystic ovary syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 90, n. 4, p. 1929-1935, Apr 2005.

ASSMANN, G.; SCHULTE, H. Relation of high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerotic coronary artery disease (the PROCAM experience). Prospective Cardiovascular Munster study. **Am J Cardiol**, 70, n. 7, p. 733-737, Sep 15 1992.

BAIANO, A.; DEL NOBILE, M. A. Antioxidant Compounds from Vegetable Matrices: Biosynthesis, Occurrence, and Extraction Systems. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 56, n. 12, p. 2053-2068, Sep 9 2016.

BAKER, J. L.; OLSEN, L. W.; SORENSEN, T. I. Childhood body-mass index and the risk of coronary heart disease in adulthood. **N Engl J Med**, 357, n. 23, p. 2329-2337, Dec 6 2007.

BANSAL, P.; WANG, Q. Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 295, n. 4, p. E751-761, Oct 2008.

BARTER, P.; GOTTO, A. M.; LAROSA, J. C.; MARONI, J. *et al.* HDL cholesterol, very low levels of LDL cholesterol, and cardiovascular events. **N Engl J Med**, 357, n. 13, p. 1301-1310, Sep 27 2007.

BARTHEL, A.; SCHMOLL, D. Novel concepts in insulin regulation of hepatic gluconeogenesis. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 285, n. 4, p. E685-692, Oct 2003.

BERENSON, G. S.; SRINIVASAN, S. R.; BAO, W.; NEWMAN, W. P., 3rd *et al.* Association between multiple cardiovascular risk factors and atherosclerosis in children and young adults. The Bogalusa Heart Study. **N Engl J Med**, 338, n. 23, p. 1650-1656, Jun 4 1998.

BLAKEMORE, S. J.; BURNETT, S.; DAHL, R. E. The role of puberty in the developing adolescent brain. **Hum Brain Mapp**, 31, n. 6, p. 926-933, Jun 2010.

BONORA, E.; TARGHER, G.; ALBERICHE, M.; BONADONNA, R. C. *et al.* Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. **Diabetes Care**, 23, n. 1, p. 57-63, Jan 2000.

BREIER, B. H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. **Domest Anim Endocrinol**, 17, n. 2-3, p. 209-218, Oct 1999.

BRETON, C. The hypothalamus-adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. **J Endocrinol**, 216, n. 2, p. R19-31, Feb 2013.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, 52, p. 302-310, 1978.

BURDGE, G. C.; HANSON, M. A.; SLATER-JEFFERIES, J. L.; LILLYCROP, K. A. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? **Br J Nutr**, 97, n. 6, p. 1036-1046, Jun 2007.

CAPRIO, S. Insulin resistance in childhood obesity. **J Pediatr Endocrinol Metab**, 15 Suppl 1, p. 487-492, Apr 2002.

CARR, D. B.; UTZSCHNEIDER, K. M.; HULL, R. L.; KODAMA, K. *et al.* Intra-abdominal fat is a major determinant of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III criteria for the metabolic syndrome. **Diabetes**, 53, n. 8, p. 2087-2094, Aug 2004.

CARVALHO, C. A.; VIOLA, P.; SPERANDIO, N. How is Brazil facing the crisis of Food and Nutrition Security during the COVID-19 pandemic? **Public Health Nutr**, 24, n. 3, p. 561-564, Feb 2021.

CHALKIADAKI, A.; GUARENTE, L. Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. **Nat Rev Endocrinol**, 8, n. 5, p. 287-296, Jan 17 2012.

CHUA, S. C., Jr.; CHUNG, W. K.; WU-PENG, X. S.; ZHANG, Y. *et al.* Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. **Science**, 271, n. 5251, p. 994-996, Feb 16 1996.

CINTI, S. The role of brown adipose tissue in human obesity. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 16, n. 8, p. 569-574, Dec 2006.

COLOMBO, G.; CLERICI, M.; GARAVAGLIA, M. E.; GIUSTARINI, D. *et al.* A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**, 1019, p. 178-190, Apr 15 2016.

CONTRERAS, A. V.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. **Adv Nutr**, 4, n. 4, p. 439-452, Jul 1 2013.

CORNIER, M. A.; DABELEA, D.; HERNANDEZ, T. L.; LINDSTROM, R. C. *et al.* The metabolic syndrome. **Endocr Rev**, 29, n. 7, p. 777-822, Dec 2008.

DA SILVA, A.; CALDAS, A. P. S.; HERMSDORFF, H. H. M.; BERSCH-FERREIRA, A. C. *et al.* Triglyceride-glucose index is associated with symptomatic coronary artery disease in patients in secondary care. **Cardiovasc Diabetol**, 18, n. 1, p. 89, Jul 11 2019.

DAVIS, P. H.; DAWSON, J. D.; RILEY, W. A.; LAUER, R. M. Carotid intimal-medial thickness is related to cardiovascular risk factors measured from childhood through middle age: The Muscatine Study. **Circulation**, 104, n. 23, p. 2815-2819, Dec 4 2001.

DE OLIVEIRA, J. C.; DE MOURA, E. G.; MIRANDA, R. A.; DE MORAES, A. M. P. *et al.* Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. **J Endocrinol**, 237, n. 3, p. 243-254, Jun 2018.

DE OLIVEIRA, J. C.; GOMES, R. M.; MIRANDA, R. A.; BARELLA, L. F. *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.; LISBOA, P. C.; DE MOURA, E. G.; BARELLA, L. F. *et al.* Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. **J Endocrinol**, 216, n. 2, p. 195-206, 2013.

DE OLIVEIRA, J. C.; MIRANDA, R. A.; BARELLA, L. F.; TORREZAN, R. *et al.* Impaired beta-cell function in the adult offspring of rats fed a protein-restricted diet during lactation is associated with changes in muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **Br J Nutr**, p. 1-9, Jul 11 2013.

DE OLIVEIRA, J. C.; MIRANDA, R. A.; BARELLA, L. F.; TORREZAN, R. *et al.* Impaired beta-cell function in the adult offspring of rats fed a protein-restricted diet during lactation is associated with changes in muscarinic acetylcholine receptor subtypes. **Br J Nutr**, 111, n. 2, p. 227-235, Jan 28 2014.

DE OLIVEIRA, J. C.; SCOMPARIN, D. X.; ANDREAZZI, A. E.; BRANCO, R. C. *et al.* Metabolic imprinting by maternal protein malnourishment impairs vagal activity in adult rats. **J Neuroendocrinol**, 23, n. 2, p. 148-157, Feb 2011.

DE ONIS, M.; MONTEIRO, C.; AKRE, J.; GLUGSTON, G. The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. **Bull World Health Organ**, 71, n. 6, p. 703-712, 1993.

DE ONIS, M.; ONYANGO, A. W.; BORGHI, E.; SIYAM, A. *et al.* Development of a WHO growth reference for school-aged children and adolescents. **Bull World Health Organ**, 85, n. 9, p. 660-667, Sep 2007.

DE WIT, C. C.; SAS, T. C.; WIT, J. M.; CUTFIELD, W. S. Patterns of catch-up growth. **J Pediatr**, 162, n. 2, p. 415-420, Feb 2013.

DORN, L. D. Measuring puberty. **J Adolesc Health**, 39, n. 5, p. 625-626, Nov 2006.

DZINAMARIRA, T.; DZOBO, M.; CHITUNGO, I. COVID-19: A perspective on Africa's capacity and response. **J Med Virol**, 92, n. 11, p. 2465-2472, Nov 2020.

ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. **Lancet**, 365, n. 9468, p. 1415-1428, Apr 16-22 2005.

EHLERT, U.; GAAB, J.; HEINRICHS, M. Psychoneuroendocrinological contributions to the etiology of depression, posttraumatic stress disorder, and stress-related bodily disorders: the role of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. **Biol Psychol**, 57, n. 1-3, p. 141-152, Jul-Aug 2001.

EVANS, J. L.; GOLDFINE, I. D.; MADDUX, B. A.; GRODSKY, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. **Endocr Rev**, 23, n. 5, p. 599-622, Oct 2002.

FAGUNDES, A. T.; MOURA, E. G.; PASSOS, M. C.; SANTOS-SILVA, A. P. *et al.* Temporal evaluation of body composition, glucose homeostasis and lipid profile of male rats programmed by maternal protein restriction during lactation. **Horm Metab Res**, 41, n. 12, p. 866-873, Dec 2009.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu Rev Biochem**, 64, p. 97-112, 1995.

GANDHI, S.; ABRAMOV, A. Y. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. **Oxid Med Cell Longev**, 2012, p. 428010, 2012.

GAO, P.; WEN, X.; OU, Q.; ZHANG, J. Which one of LDL-C /HDL-C ratio and non-HDL-C can better predict the severity of coronary artery disease in STEMI patients. **BMC Cardiovasc Disord**, 22, n. 1, p. 318, Jul 17 2022.

GRIFFIN, I. J. Catch-Up Growth: Basic Mechanisms. **Nestle Nutr Inst Workshop Ser**, 81, p. 87-97, 2015.

GUSTAT, J.; SRINIVASAN, S. R.; ELKASABANY, A.; BERENSON, G. S. Relation of self-rated measures of physical activity to multiple risk factors of insulin resistance syndrome in young adults: the Bogalusa Heart Study. **J Clin Epidemiol**, 55, n. 10, p. 997-1006, Oct 2002.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; FLEISCHNER, G.; GATMAITAN, Z. *et al.* The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 71, n. 10, p. 3879-3882, Oct 1974.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. **Nutr Rev**, 70, n. 5, p. 257-265, May 2012.

HEIJMANS, B. T.; TOBI, E. W.; STEIN, A. D.; PUTTER, H. *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.

HEIM, C.; EHLERT, U.; HELLHAMMER, D. H. The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. **Psychoneuroendocrinology**, 25, n. 1, p. 1-

35, Jan 2000.

HIMMS-HAGEN, J. Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. **FASEB J**, 4, n. 11, p. 2890-2898, Aug 1990.

HOLDER, M. K.; BLAUSTEIN, J. D. Puberty and adolescence as a time of vulnerability to stressors that alter neurobehavioral processes. **Front Neuroendocrinol**, 35, n. 1, p. 89-110, Jan 2014.

IHEMELANDU, E. C. Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. **Acta Anat (Basel)**, 121, n. 2, p. 89-93, 1985.

INEU, M. L.; MANENTI, E.; DA COSTA, J. L.; MORIGUCHI, E. HDL management: recent advances and perspectives beyond LDL reduction. **Arq Bras Cardiol**, 87, n. 6, p. 788-794, Dec 2006.

JANKORD, R.; HERMAN, J. P. Limbic regulation of hypothalamo-pituitary-adrenocortical function during acute and chronic stress. **Ann N Y Acad Sci**, 1148, p. 64-73, Dec 2008.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, 8, n. 9-10, p. 1865-1879, Sep-Oct 2006.

KAHN, S. E. The relative contributions of insulin resistance and beta-cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. **Diabetologia**, 46, n. 1, p. 3-19, Jan 2003.

KELLY, T.; YANG, W.; CHEN, C. S.; REYNOLDS, K. *et al.* Global burden of obesity in 2005 and projections to 2030. **Int J Obes (Lond)**, 32, n. 9, p. 1431-1437, Sep 2008.

KHOURY, J.; ZOHAR, Y.; SHEHADEH, N.; SAADI, T. Glycogenic hepatopathy. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, 17, n. 2, p. 113-118, Apr 2018.

KORENBROT, C. C.; HUHTANIEMI, I. T.; WEINER, R. I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biol Reprod**, 17, n. 2, p. 298-303, Sep 1977.

KREUZ, S.; FISCHLE, W. Oxidative stress signaling to chromatin in health and disease. **Epigenomics**, 8, n. 6, p. 843-862, Jun 2016.

KUMANYIKA, S. K. Advancing Health Equity Efforts to Reduce Obesity: Changing the Course. **Annu Rev Nutr**, 42, p. 453-480, Aug 22 2022.

LAN, J.; HUANG, Z.; HAN, J.; SHAO, J. *et al.* Redox regulation of microRNAs in cancer. **Cancer Lett**, 418, p. 250-259, Apr 1 2018.

LAUTERBACH, M. A.; WUNDERLICH, F. T. Macrophage function in obesity-induced inflammation and insulin resistance. **Pflugers Arch**, 469, n. 3-4, p. 385-396, Apr 2017.

LAZNIEWSKA, J.; DARBY, J. R. T.; HOLMAN, S. L.; SORVINA, A. *et al.* In utero substrate restriction by placental insufficiency or maternal undernutrition decreases optical redox ratio in foetal perirenal fat. **J Biophotonics**, 14, n. 4, p. e202000322, Apr 2021.

LEE, J.; CHOI, J.; SCAFIDI, S.; WOLFGANG, M. J. Hepatic Fatty Acid Oxidation Restrains Systemic Catabolism during Starvation. **Cell Rep**, 16, n. 1, p. 201-212, Jun 28 2016.

LEMIEUX, I.; PASCOT, A.; COUILLARD, C.; LAMARCHE, B. *et al.* Hypertriglyceridemic waist: A marker of the atherogenic metabolic triad (hyperinsulinemia; hyperapolipoprotein B; small, dense LDL) in men? **Circulation**, 102, n. 2, p. 179-184, Jul 11 2000.

LI, J.; REN, L.; CHANG, C.; LUO, L. Triglyceride-Glukose Index Predicts Adverse Events in Patients with Acute Coronary Syndrome: A Meta-Analysis of Cohort Studies. **Horm Metab Res**, 53, n. 9, p. 594-601, Sep 2021.

LI, S.; CHEN, W.; SRINIVASAN, S. R.; BOND, M. G. *et al.* Childhood cardiovascular risk factors and carotid vascular changes in adulthood: the Bogalusa Heart Study. **JAMA**, 290, n. 17, p. 2271-2276, Nov 5 2003.

LIGUORI, I.; RUSSO, G.; CURCIO, F.; BULLI, G. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. **Clin Interv Aging**, 13, p. 757-772, 2018.

LILLYCROP, K. A.; SLATER-JEFFERIES, J. L.; HANSON, M. A.; GODFREY, K. M. *et al.* Induction of altered epigenetic regulation of the hepatic glucocorticoid receptor in the offspring of rats fed a protein-restricted diet during pregnancy suggests that reduced DNA methyltransferase-1 expression is involved in impaired DNA methylation and changes in histone modifications. **Br J Nutr**, 97, n. 6, p. 1064-1073, Jun 2007.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacogn Rev**, 4, n. 8, p. 118-126, Jul 2010.

LUO, E.; WANG, D.; YAN, G.; QIAO, Y. *et al.* High triglyceride-glucose index is associated with poor prognosis in patients with acute ST-elevation myocardial infarction after percutaneous coronary intervention. **Cardiovasc Diabetol**, 18, n. 1, p. 150, Nov 13 2019.

MARROQUI, L.; BATISTA, T. M.; GONZALEZ, A.; VIEIRA, E. *et al.* Functional and structural adaptations in the pancreatic alpha-cell and changes in glucagon signaling during protein malnutrition. **Endocrinology**, 153, n. 4, p. 1663-1672, Apr 2012.

MARSHALL, W. A.; TANNER, J. M. Variations in pattern of pubertal changes in girls. **Arch Dis Child**, 44, n. 235, p. 291-303, Jun 1969.

MARSHALL, W. A.; TANNER, J. M. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. **Arch Dis Child**, 45, n. 239, p. 13-23, Feb 1970.

MATHIAS, P. C. F.; MIRANDA, G. D. S.; BARELLA, L. F.; MIRANDA, R. 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.

MCINNES, K. J.; SMITH, L. B.; HUNGER, N. I.; SAUNDERS, P. T. *et al.* Deletion of the androgen receptor in adipose tissue in male mice elevates retinol binding protein 4 and reveals independent effects on visceral fat mass and on glucose homeostasis. **Diabetes**, 61, n. 5, p. 1072-1081, May 2012.

MIRANDA, G. D. S.; DE LIMA, T. A. L.; COSTERMANI, H. O.; RICKEN, C. *et al.* Breastfeeding undernutrition changes iBAT-involved thermogenesis protein expression and leads to a lean phenotype in adult rat offspring. **J Nutr Biochem**, 99, p. 108857, Jan 2022.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The generation of superoxide radical during the autoxidation of ferredoxins. **J Biol Chem**, 246, n. 22, p. 6886-6890, Nov 25 1971.

MISRA, M.; KLIBANSKI, A. Anorexia Nervosa and Its Associated Endocrinopathy in Young People. **Horm Res Paediatr**, 85, n. 3, p. 147-157, 2016.

MORRIS, M. J.; TORTELLI, C. F.; FILIPPIS, A.; PROIETTO, J. Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. **Regul Pept**, 75-76, p. 441-447, Sep 25 1998.

MUNZEL, T.; CAMICI, G. G.; MAACK, C.; BONETTI, N. R. *et al.* Impact of Oxidative Stress on the Heart and Vasculature: Part 2 of a 3-Part Series. **J Am Coll Cardiol**, 70, n. 2, p. 212-229, Jul 11 2017.

NAGATA, M.; SUZUKI, W.; IIZUKA, S.; TABUCHI, M. *et al.* Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. **Exp Anim**, 55, n. 2, p. 109-115, Apr 2006.

NATIONAL CHOLESTEROL EDUCATION PROGRAM EXPERT PANEL ON DETECTION, E.; TREATMENT OF HIGH BLOOD CHOLESTEROL IN, A. Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, 106, n. 25, p. 3143-3421, Dec 17 2002.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Anal Biochem**, 49, n. 2, p. 474-478, Oct 1972.

NG, M.; FLEMING, T.; ROBINSON, M.; THOMSON, B. *et al.* Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. **Lancet**, 384, n. 9945, p. 766-781, Aug 30 2014.

NORTON, L.; SHANNON, C.; GASTALDELLI, A.; DEFRONZO, R. A. Insulin: The master regulator of glucose metabolism. **Metabolism**, 129, p. 155142, Apr 2022.

OJEDA, S. R.; WHEATON, J. E.; JAMESON, H. E.; MCCANN, S. M. The onset of puberty in the female rat: changes in plasma prolactin, gonadotropins, luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH), and hypothalamic LHRH content. **Endocrinology**, 98, n. 3, p. 630-638, Mar 1976.

PANDE, D.; NEGI, R.; KARKI, K.; KHANNA, S. *et al.* Oxidative damage markers as possible discriminatory biomarkers in breast carcinoma. **Transl Res**, 160, n. 6, p. 411-418, Dec 2012.

PARK, Y. W.; ZHU, S.; PALANIAPPAN, L.; HESHKA, S. *et al.* The metabolic syndrome: prevalence and associated risk factor findings in the US population from the Third National

Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1994. **Arch Intern Med**, 163, n. 4, p. 427-436, Feb 24 2003.

PARRELA, J.; BORKENHAGEN, I. R.; SALMERON, S. R. F.; LIMA, T. A. L. *et al.* Intrauterine malnutrition disrupts leptin and ghrelin milk hormones, programming rats. **J Endocrinol**, 255, n. 1, p. 11-23, Oct 1 2022.

PASLAKIS, G.; DIMITROPOULOS, G.; KATZMAN, D. K. A call to action to address COVID-19-induced global food insecurity to prevent hunger, malnutrition, and eating pathology. **Nutr Rev**, 79, n. 1, p. 114-116, Jan 1 2021.

PEREZ-ESCAMILLA, R.; CUNNINGHAM, K.; MORAN, V. H. COVID-19 and maternal and child food and nutrition insecurity: a complex syndemic. **Matern Child Nutr**, 16, n. 3, p. e13036, Jul 2020.

PERVANIDOU, P.; CHROUSOS, G. P. Stress and obesity/metabolic syndrome in childhood and adolescence. **Int J Pediatr Obes**, 6 Suppl 1, p. 21-28, Sep 2011.

PERVANIDOU, P.; CHROUSOS, G. P. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. **Metabolism**, 61, n. 5, p. 611-619, May 2012.

PHILLIPS, M. S.; LIU, Q.; HAMMOND, H. A.; DUGAN, V. *et al.* Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. **Nat Genet**, 13, n. 1, p. 18-19, May 1996.

PIHLAJOKI, M.; DORNER, J.; COCHRAN, R. S.; HEIKINHEIMO, M. *et al.* Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 6, p. 27, 2015.

PINHO, L.; BRITO, M.; SILVA, R. R. V.; MESSIAS, R. B. *et al.* Perception of body image and nutritional status in adolescents of public schools. **Rev Bras Enferm**, 72, n. suppl 2, p. 229-235, Nov 2019.

POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends Endocrinol Metab**, 20, n. 7, p. 332-340, Sep 2009.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 115, n. 23, p. 5839-5848, Jun 5 2018.

RAVIPATI, A. S.; ZHANG, L.; KOYYALAMUDI, S. R.; JEONG, S. C. *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected Chinese medicinal plants and their relation with antioxidant content. **BMC Complement Altern Med**, 12, p. 173, Oct 6 2012.

REAVEN, G. M. Banting lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. **Diabetes**, 37, n. 12, p. 1595-1607, Dec 1988.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free Radic Biol Med**, 49, n. 11, p. 1603-1616, Dec 1 2010.

RIBEIRO-SILVA, R. C.; PEREIRA, M.; CAMPELLO, T.; ARAGAO, E. *et al.* Covid-19 pandemic implications for food and nutrition security in Brazil. **Cien Saude Colet**, 25, n. 9, p.

3421-3430, Sep 2020.

RIBEIRO, R. A.; SANTOS-SILVA, J. C.; VETTORAZZI, J. F.; COTRIM, B. B. *et al.* Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. **Amino Acids**, 43, n. 4, p. 1791-1801, Oct 2012.

RIVERA-MANCIA, S.; COLIN-RAMIREZ, E.; CARTAS-ROSADO, R.; INFANTE, O. *et al.* Indicators of accumulated fat are stronger associated with prehypertension compared with indicators of circulating fat: A cross-sectional study. **Medicine (Baltimore)**, 97, n. 34, p. e11869, Aug 2018.

RODRIGUES, M. B.; MATOS, J. P.; HORTA, P. M. The COVID-19 pandemic and its implications for the food information environment in Brazil. **Public Health Nutr**, 24, n. 2, p. 321-326, Feb 2021.

ROE, J. H. Chemical determination of ascorbic, dehydroascorbic, and diketogulonic acids. **Methods Biochem Anal**, 1, p. 115-139, 1954.

ROMSOS, D. R. Efficiency of energy retention in genetically obese animals and in dietary-induced thermogenesis. **Fed Proc**, 40, n. 10, p. 2524-2529, Aug 1981.

ROSS, I. L.; LOUW, G. J. Embryological and molecular development of the adrenal glands. **Clin Anat**, 28, n. 2, p. 235-242, Mar 2015.

ROWE, R. W. Effect of low nutrition on size of striated muscle fibres in the mouse. **J Exp Zool**, 167, n. 3, p. 353-358, Mar 1968.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Compr Physiol**, 4, n. 1, p. 177-197, Jan 2014.

SAAD, F.; YASSIN, A.; DOROS, G.; HAIDER, A. Effects of long-term treatment with testosterone on weight and waist size in 411 hypogonadal men with obesity classes I-III: observational data from two registry studies. **Int J Obes (Lond)**, 40, n. 1, p. 162-170, Jan 2016.

SAKLAYEN, M. G. The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. **Curr Hypertens Rep**, 20, n. 2, p. 12, Feb 26 2018.

SANKHLA, M.; SHARMA, T. K.; MATHUR, K.; RATHOR, J. S. *et al.* Relationship of oxidative stress with obesity and its role in obesity induced metabolic syndrome. **Clin Lab**, 58, n. 5-6, p. 385-392, 2012.

SANTANAM, N.; SHERN-BREWER, R.; MCCLATCHEY, R.; CASTELLANO, P. Z. *et al.* Estradiol as an antioxidant: incompatible with its physiological concentrations and function. **J Lipid Res**, 39, n. 11, p. 2111-2118, Nov 1998.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, 25, n. 1, p. 192-205, Oct 24 1968.

SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**, 91, n. 3C, p. 31S-38S, Sep 30 1991.

SISK, C. L.; ZEHR, J. L. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. **Front Neuroendocrinol**, 26, n. 3-4, p. 163-174, Oct-Dec 2005.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neurosci Biobehav Rev**, 24, n. 4, p. 417-463, Jun 2000.

STAMLER, J.; DAVIGLUS, M. L.; GARSIDE, D. B.; DYER, A. R. *et al.* Relationship of baseline serum cholesterol levels in 3 large cohorts of younger men to long-term coronary, cardiovascular, and all-cause mortality and to longevity. **JAMA**, 284, n. 3, p. 311-318, Jul 19 2000.

STEINBERG, D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. **J Lipid Res**, 50 Suppl, n. Suppl, p. S376-381, Apr 2009.

STRANAHAN, A. M. Visceral adiposity, inflammation, and hippocampal function in obesity. **Neuropharmacology**, 205, p. 108920, Mar 1 2022.

SUN, S. S.; LIANG, R.; HUANG, T. T.; DANIELS, S. R. *et al.* Childhood obesity predicts adult metabolic syndrome: the Fels Longitudinal Study. **J Pediatr**, 152, n. 2, p. 191-200, Feb 2008.

TOLEDO-RODRIGUEZ, M.; SANDI, C. Stress before puberty exerts a sex- and age-related impact on auditory and contextual fear conditioning in the rat. **Neural Plast**, 2007, p. 71203, 2007.

TOUBOUL, P. J.; VICAUT, E.; LABREUCHE, J.; ACEVEDO, M. *et al.* Common carotid artery intima-media thickness: the Cardiovascular Risk Factor Multiple Evaluation in Latin America (CARMELA) study results. **Cerebrovasc Dis**, 31, n. 1, p. 43-50, 2011.

TSCHOP, M.; HEIMAN, M. L. Overview of rodent models for obesity research. **Curr Protoc Neurosci**, Chapter 9, p. Unit 9 10, Feb 2002.

VAAG, A. A.; GRUNNET, L. G.; ARORA, G. P.; BRONS, C. The thrifty phenotype hypothesis revisited. **Diabetologia**, 55, n. 8, p. 2085-2088, Aug 2012.

VAN ABEELLEN, A. F.; ELIAS, S. G.; BOSSUYT, P. M.; GROBBEE, D. E. *et al.* Famine exposure in the young and the risk of type 2 diabetes in adulthood. **Diabetes**, 61, n. 9, p. 2255-2260, Sep 2012.

VANDENBERGH, J. G. Effect of the presence of a male on the sexual maturation of female mice. **Endocrinology**, 81, n. 2, p. 345-349, Aug 1967.

VANDENBERGH, J. G. Male odor accelerates female sexual maturation in mice. **Endocrinology**, 84, n. 3, p. 658-660, Mar 1969.

VARGAS, H. O.; NUNES, S. O.; BARBOSA, D. S.; VARGAS, M. M. *et al.* Castelli risk indexes 1 and 2 are higher in major depression but other characteristics of the metabolic syndrome are not specific to mood disorders. **Life Sci**, 102, n. 1, p. 65-71, Apr 25 2014.

VIAU, V. Functional cross-talk between the hypothalamic-pituitary-gonadal and -adrenal axes.

J Neuroendocrinol, 14, n. 6, p. 506-513, Jun 2002.

VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Int J Obes (Lond)**, 30, n. 3, p. 400-418, Mar 2006.

WANG, Y.; ZHOU, M.; LAM, K. S.; XU, A. Protective roles of adiponectin in obesity-related fatty liver diseases: mechanisms and therapeutic implications. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 53, n. 2, p. 201-212, Mar 2009.

WIECHERT, M.; HOLZAPFEL, C. Nutrition Concepts for the Treatment of Obesity in Adults. **Nutrients**, 14, n. 1, Dec 30 2021.

WON, E. T.; BORSKI, R. J. Endocrine regulation of compensatory growth in fish. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 4, p. 74, 2013.

XAVIER, H. T.; IZAR, M. C.; FARIA NETO, J. R.; ASSAD, M. H. *et al.* [V Brazilian Guidelines on Dyslipidemias and Prevention of Atherosclerosis]. **Arq Bras Cardiol**, 101, n. 4 Suppl 1, p. 1-20, Oct 2013.

XUE, Y.; GUO, C.; HU, F.; ZHU, W. *et al.* Undernutrition-induced lipid metabolism disorder triggers oxidative stress in maternal and fetal livers using a model of pregnant sheep. **FASEB J**, 34, n. 5, p. 6508-6520, May 2020.

YAMAMOTO, M.; IGUCHI, G.; FUKUOKA, H.; SUDA, K. *et al.* SIRT1 regulates adaptive response of the growth hormone--insulin-like growth factor-I axis under fasting conditions in liver. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 110, n. 37, p. 14948-14953, Sep 10 2013.

YATES, R.; KATUGAMPOLA, H.; CAVLAN, D.; COGGER, K. *et al.* Adrenocortical development, maintenance, and disease. **Curr Top Dev Biol**, 106, p. 239-312, 2013.

YU, X.; WANG, L.; ZHANG, W.; MING, J. *et al.* Fasting triglycerides and glucose index is more suitable for the identification of metabolically unhealthy individuals in the Chinese adult population: A nationwide study. **J Diabetes Investig**, 10, n. 4, p. 1050-1058, Jul 2019.

ZHAO, S.; YU, S.; CHI, C.; FAN, X. *et al.* Association between macro- and microvascular damage and the triglyceride glucose index in community-dwelling elderly individuals: the Northern Shanghai Study. **Cardiovasc Diabetol**, 18, n. 1, p. 95, Jul 25 2019.

ZIMMET, P.; ALBERTI, G.; KAUFMAN, F.; TAJIMA, N. *et al.* The metabolic syndrome in children and adolescents. **Lancet**, 369, n. 9579, p. 2059-2061, Jun 23 2007.

8 ARTIGO

Short- and long-term effects on oxidative status and glucose homeostasis in male and female rats undernourished during adolescence

Joskame Saint Paul¹, Antônio José Rocha Ribeiro¹, Ana Caroline Schoenberger Kipper¹, Mariele de Oliveira Souza¹, Thiara Chaves dos Santos¹, Karoline Paiva da Silva¹, Aline Milena Dantas Rodrigues¹, Manoela Fontenele Antunes¹, Isabelle Zanata Fabiane², Ana Júlia Lopes Braga³, Valéria Dornelles Gindri Senhorin³, Renata de Azevedo Melo Luvizotto Nascimento², Júlio Cezar de Oliveira¹

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, ³Integrated Laboratory of Chemical Research (LiPEQ), Institute of Exact and Earth Sciences, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil.

Correspondence to: Júlio Cezar de Oliveira, 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

E-mail address: julio.oliveiral@ufmt.br; Phone: + 55 (66) 9 8142-7316.

Short title: Undernutrition in puberty programs iBAT oxidative stress in male differently of female

Word count: 4,632

Reference count: 45

Figure and table count: 6

Abstract

We examined the short- and long-term effects of undernutrition during adolescence on the body composition, glucose homeostasis and redox status in male and female rats. Wistar male and female rats, from 30- to 60-days-old, were fed a rodent chow reduced by 50% (FR50 group) of the amount fed by control rats (FR50 group) and fed *ad libitum* from 60- to 120-days-old. Rats were euthanized at 60- or 120-days-old. Food and water consumption, body weight, skeletal muscle and visceral fat depot, liver, interscapular brown adipose tissue (iBAT), glucose homeostasis and oxidative stress markers in liver and iBAT were evaluated. The FR50 male (FR50-M) and female (FR50-F) rats were hypophagic, leaner, hypoglycemic, hypoinsulinemic and hypoleptinemic at 60-days-old ($P<0.05$). These rats exhibited a lean phenotype just after undermatron period, but an obese phenotype as long-term consequence, as well as displaying higher insulin sensitivity and glucose tolerance, even the redox status has been increasing as short-term effect it did not remain at long-term consequence. Yet, FR50-M rats display a negative effect on the redox status in thermogenic tissue. In summer, undernutrition during adolescence affects equally the body composition, glucose homeostasis and redox status in male and female, but at adulthood only male rats present reduced protection against oxidative stress.

Keywords: Metabolic programming, undernutrition, puberty, oxidative stress

Introduction

Undernutrition still is a social problem underlying several kinds of diseases, which is a burden for millions of people around the world. It makes, especially children, much more vulnerable to disease and death. In fact, nearly half of deaths among children under 5 years of age, mostly in low- and middle-income countries, are linked to undernutrition (WHO, 2024). Into the developmental origins of health and disease (DOHaD) paradigm, different cardiometabolic impairments such as obesity, hypertension and type 2 diabetes *mellitus* (T2DM) have been associated with protein and/or calorie-energy malnutrition during critical stages of development (Barker 2004; Ravelli, et al. 1999; Uauy, et al. 2011).

Using a poor protein diet offered to male rats during the developing stage since 30- up to 60-days-old, our team put out the first evidence that adolescence is one critical window for programming long-term metabolic disruptions, including high risk for obesity and T2DM (de Oliveira, et al. 2013). In our studies, using this rat model, we reported that malnutrition during adolescence programs neuroendocrine disfunctions in hypothalamic-pituitary- adrenal (HPA) and gonadal (HPG) axes and in pancreatic islets (de Oliveira, et al. 2018), as well we showed that effects of undernutrition on metabolism and body composition is more prominent when this nutritional insult occurs at adolescence (Malta, et al. 2016; Malta, et al. 2014).

The status of undernutrition is directly involved in the unbalanced redox status (Xue, et al. 2020), which has been shown to be associated with different dysfunctions and affect different organ and/or tissues in both rodents and humans. Given that, the cognitive function in the brain of mouse whose mothers underwent protein malnutrition in pregnancy and lactation (Ferroni, et al. 2023). As known, during the period of undernutrition several changes takes place in the organism to allow adaptation for the present condition, amongst them activation of several gene transcription factors as such SIRT1 protein (Griffin 2015), that are involved in activation of oxidative stress enzymes like that superoxide dismutase (SOD) to remove the free radicals (Qiu, et al. 2010), which can influence long-term consequences on the redox status and associated of it to the energy and glucose metabolism.

In this regard, in the present study we hypothesized that undernutrition during puberty would negatively affect, as long-term consequence, the rat's liver and iBAT redox status and glucose homeostasis. Therefore, we aimed to assess the short- and long-term effects of undernutrition during adolescence on the body composition, glucose homeostasis and redox status in the liver and iBAT from male and female rats in a view of sex-dependent effect.

Materials and methods

Ethical approval

The protocols were approved by the Ethics Committee for the Animal Use and Experiments of the Federal University of Mato Grosso (CEUA/UFMT; process number 23108.021234-2024-73), which adheres to the Brazilian Federal Law number 11.794/2008. Our study complies with the animal ethics checklist as described in the ARRIVE guidelines 2.0 (Percie du Sert, et al. 2020).

Experimental design and diet treatment

All the rats were maintained under controlled conditions of temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity ($55\pm 5\%$) and lighting (12 hours light cycle with light on: 06:00 AM–06:00 PM), throughout protocol.

The male and female Wistar rats at 30 days-old were randomly assigned to two different groups. The control male (CONT-M, $n=32$ rats) and female (CONT-F $n=32$ rats) rats were fed a rodent chow (Nuvital[®], Curitiba, PR, Brazil) *ad libitum* throughout experimental protocol, and the undernourished group were fed a rodent chow reduced by 50% of the amount fed by the control male and female rats at the same age (from 30 to 60 days-old). The food restricted male (FR50-M, $n=32$ rats) and female (FR50-F, $n=32$ rats) rats were fed *ad libitum* from 60 to 120 days-old.

Food consumption, drinking water and body weight assessment

The food and drinking water consumption, as well as body weight were assessed every two days since weaning (22 days-old) until the end of experiment protocol (120 days-old). Absolute food intake was calculated as the difference between the total food placed two days before (Food_{initial}) and the amount of food remaining (Food_{final}), divided by the number of days and the number of rats per cage: $[\text{FI}_{(g)} = (\text{Food}_{\text{initial}} - \text{Food}_{\text{final}})/2/4]$. The calculation was performed to assess drinking water consumption.

Relative food intake and drinking water consumption were calculated as the value of absolute food (in grams) or absolute drinking water (in milliliters) intake divided by the mean of body weight from the 4 rats in the same cage.

Glucose-insulin homeostasis assessment

The intraperitoneal glucose tolerance test (ipGTT) was performed after food deprivation for 12 hours (6:00 AM–6:00 PM), with free access to drinking water. A blood sample was initially collected before the initial glucose load (0 min, basal glycemia) and then a glucose load (2 g/kg body weight) was injected intraperitoneally into the conscious rats. After that, at 30, 60, 90 and 120 minutes a 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, 48 hours after the ipGTT, rats were fasted for 4 hours (2:00 AM–6:00 PM), with free access to drinking water. Blood samples for blood glucose measurements were collected immediately before the insulin injection (0 min, basal) and then the insulin (1 IU/kg bw) was

administrated intraperitoneally into the conscious rats. After that, at 15, 30, 45 and 60 minutes after insulin injection 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).

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).

Body mass composition assessment

To assess short- and long-term consequences of undernutrition performed during adolescence, one half of rats ($n=16$) in each group were euthanized at 60 days-old and the other ($n=16$) at 120-days-old.

The overnight fasted rats were euthanized by decapitation. Next, blood, liver, iBAT and the white adipose visceral tissue (periovarian or periepididimal, retroperitoneal and mesenteric), as well as the skeletal muscle (soleus and extensor digitorum longus, EDL) as the representative for lean mass were removed and weighed.

The adiposity index was used to assess the amount of body fat of the rats. For this, the sum of visceral fat depot normalized by the rat body weight was used as follow calculation: adiposity index = [(periovarian or periepididimal + 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].

Blood samples were centrifuged (10 minutes at 1,248 g) and plasma stored at -20°C for lipid profile assessment.

The liver and iBAT oxidative status assessment

To investigate the redox status, the levels of biomarkers of lipid and protein damage, as well as the antioxidant enzyme catalase (CAT) were determined in the liver and iBAT of rats.

The levels of lipid peroxidation were assessed by determining the levels of substances reactive to thiobarbituric acid (TBARS). The TBARS concentration was expressed as nmol of malondialdehyde (MDA) g tissue⁻¹, following the calibration curve for MDA.

The levels of protein carbonylation were determined by spectrophotometry after 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization (Colombo, et al. 2016) with some modifications, where the content of carbonyl was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 per M per cm and is expressed as nmol carbonyls/mg protein.

To assess the CAT enzymatic activity was performed by the decomposition of H₂O₂ technique, which is expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ (Nelson and Kiesow 1972), where the protein quantification was performed by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as a standard, measuring the absorbance at 595 nm.

Statistical analyses

The results are given as the mean $\pm$ the SD and were subjected to the Shapiro-Wilk normality test. Data that assumed Gaussian distribution were subjected to the parametric test [one way analyse of variance (one-way ANOVA), followed by the Tukey's multiple comparisons post-

test]. For data that did not assume Gaussian distribution, it was used nonparametric test (Kruskal-Wallis followed by the Dunn's multiple comparisons post-test).

To assess the correlation among parameters involving rat-offspring's body weight gain, milk intake and maternal adiposity it was performed a Pearson correlation.

Tests were performed using GraphPad Prism version 8.0 for Windows (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA), in which $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Food and drinking water consumption and body weight gain

Assessing food intake before undernutrition treatment, it did not differ among groups ($P>0.05$, Fig. 1A-C). Assessing food intake throughout the period of undernutrition (since 30 up to 60 days-old), as expected the area under the curve (AUC) of FR50-M rats was 26.66% smaller than AUC of CONT-M, as well as FR50-F fed 24.40% less than CONT-F ($P<0.001$, Fig. 1A-D). At 60 days-old, FR50-M rats were feeding 20.37% less than CONT-M ones and FR50-F fed 18.45% less than CONT-F rats ($P<0.001$, Fig. 1A-B). Yet, food intake did not differ between CONT-M *versus* CONT-F nor between FR50-M *versus* FR50-F at 60 days-old and throughout the period of undernutrition ($P>0.05$, Fig. 1A, B and D).

During the period post-undernutrition (since 60 up to 120 days-old), food intake was increased by 33.35% in FR50-M group in relation to CONT-M and by 23.88% in FR50-F group compared to CONT-F ($P<0.001$, Fig. 1A and E). In addition, the food intake of CONT-F group was 5.30% higher than CONT-M ($P<0.05$, Fig. 1A and E), while it did not differ between FR50-M *versus* FR50-F ($P>0.05$, Fig. 1A and E). At 120 days-old, there were no statistical differences among the groups ($P>0.05$, Fig. 1A, B and D).

Regarding drinking water, it did not differ among groups before ($P>0.05$, Fig. 2A-C) and after undernutrition treatment ($P>0.05$, Fig. 2A, B and E). On the other hand, during the period of undernutrition, compared to CONT-M the consumption of drinking water increased by 21.01% in FR50-M group ($P<0.05$, Fig. 2A and D) and by 22.47% in FR50-F *versus* CONT-F group ($P<0.05$, Fig. 2A and D). At 60 days-old, FR50-M rats were drinking 33.61% more water than CONT-M ($P<0.01$, Fig. 2A and B) and FR50-F group drunk 29.13% more than CONT-F rats ($P<0.01$, Fig. 2A and B). Water intake did not differ between CONT-M *versus* CONT-F nor between FR50-M *versus* FR50-F at 60 days-old and throughout the period of undernutrition ($P>0.05$, Fig. 2A, B and D).

The body weight of rats did not change among groups before the period of undernutrition ($P>0.05$, Fig. 3A-C). By other side, assessing the body weight gain throughout the period from 30 up to 60 days-old, it was observed that the FR50-M rats were 36.37% lighter than CONT-M and that the FR50-F were 22.74% lighter than CONT-F ($P<0.001$, Fig. 3A and D). While the AUC of CONT-F group was 22.70% smaller than CONT-M group ($P<0.001$, Fig. 3D), it did not change between FR50-F *versus* FR50-M ($P>0.05$, Fig. 3D).

At 60 days-old, in both sexes, FR50 rats were leaner than CONT rats. In relation to CONT-M, the FR50-M rats exhibited body weight reduced by 45.27% ($P<0.001$, Fig. 3A-B) and body length reduced by 11.60% ($P<0.001$, *data did not show*), as well as FR50-F group display body weight 27.57% smaller than CONT-F group ($P<0.001$, Fig. 3A-B), without statistical changes in body length ($P>0.05$, *data did not show*). While the body weight of CONT-F was 29.67% smaller than CONT-M ($P<0.001$, Fig. 3A-B), it did not differ between FR50-M *versus* FR50-F ($P>0.05$, Fig. 3A-B). The body length was 13.39% smaller in CONT-F *versus* CONT-M ($P<0.001$, *data did not show*) and 8.00% smaller in FR50-F *versus* FR50-M rats ($P<0.01$, *data did not show*).

The body weight of FR50-M and FR50-F rats did not differ from their respective counterparts both in period throughout post-undernutrition ($P>0.05$, Fig. 3A and E) and at 120 days-old ($P>0.05$, Fig. 3A-B). However, the CONT-F group was lighter than CONT-M in both of

assessed parameters (at 120 days-old: 35.28%, $P<0.001$, Fig. 3A-B and from 60 to 120 days-old in post-undernutrition period: 37.03%, $P<0.001$, Fig. 3E). Likewise, at 120 days-old the FR50-F rats display body weight reduced by 39.95% in relation to FR50-M rats ($P<0.001$, Fig. 3A-B) and reduced by 33.40 when the period post-undernutrition was compared ($P<0.01$, Fig. 3E).

Murinometric parameters

At 60 days-old, in relation to the counterparts, the adiposity index was reduced by 62.19% in FR50-M and by 57.34% in FR50-F rats ($P<0.001$, Fig. 4A). There was no statistical difference between CONT-M *versus* CONT-F and between FR50-M *versus* FR50-F ($P>0.05$, Fig. 4A). The lean mass index was reduced by 11.27% in FR50-M compared to CONT-M ($P<0.05$, Fig. 4B), but not statistically different between FR50-F *versus* CONT-F ($P>0.05$, Fig. 4B). In CONT-F *versus* CONT-M rats lean mass index reduced by 9.94% ($P<0.05$, Fig. 4B) but did not differ between FR50-F *versus* FR50-M rats ($P>0.05$, Fig. 4B).

At 60 days-old, FR50-M rats display iBAT 32.70% smaller than CONT-M ($P<0.001$, Fig. 4C). By its turn, iBAT in FR50-F was reduced by 17.50% in relation to CONT-F ($P<0.05$, Fig. 4C). While iBAT did not differ between CONT-F *versus* CONT-M, it increased by 28.04% in FR50-F *versus* FR50-M ($P<0.01$, Fig. 4C). Compared to its counterparts, the liver mass at 60 days-old increased by 10.45% in FR50-M and by 12.79% in FR50-F rats ($P<0.001$, Fig. 4D). There was no statistical difference between liver mass of CONT-F *versus* CONT-M and between FR50-F *versus* FR50-M ($P>0.05$, Fig. 4D).

At 120 days-old, the adiposity index increased by 36.00% in FR50-M *versus* CONT-M ($P<0.01$, Fig. 4E) and in FR50-F *versus* CONT-F rats ($P<0.05$, Fig. 4E). There was no statistical difference between CONT-M *versus* CONT-F and between FR50-M *versus* FR50-F ($P>0.05$, Fig. 4E). Compared to CONT-M rats, the lean mass index reduced by 15.65% in FR50-M ($P<0.05$, Fig. 4F), but it was not statistically different between FR50-F *versus* CONT-F ($P>0.05$, Fig. 4F). Comparing the CONT-F *versus* CONT-M rats, lean mass index did not differ between them, but when comparing the FR50-F *versus* FR50-M rats, it was increased by 19.32% in FR50-F group ($P<0.05$, Fig. 4F).

At 120 days-old, the iBAT mass did not differ between FR50-M *versus* CONT-M rats and between FR50-F *versus* CONT-F rats ($P>0.05$, Fig. 4G), however it increased into sexes in both dietary-treated groups, where the iBAT of CONT-F was 16.4% higher than CONT-M and 31.34% higher in FR50-F *versus* FR50-M ($P<0.05$, Fig. 4G). Compared to its counterparts, the liver mass at 120 days-old increased by 10.34% in FR50-M and by 12.97% in FR50-F rats ($P<0.05$, Fig. 4H). There was no statistical difference between the liver mass of CONT-F *versus* CONT-M and between FR50-F *versus* FR50-M ($P>0.05$, Fig. 4H).

Glucose-insulin homeostasis

At 60 days-old, fast glycemia of rats did not differ among groups ($P>0.05$, Fig. 5A). During the ipGTT, the AUC of glycemia from FR50-M rats was reduced by 15.17% in relation to CONT-M rats ($P<0.01$, Fig. 5B-C), even though it did not show statistical difference between FR50-F *versus* CONT-F rats ($P>0.05$, Fig. 5B-C). Also, the AUC of CONT-F *versus* CONT-M did differ ($P>0.05$, Fig. 5B-C). Regarding the Kitt at 60 days-old, it increased by 78.40% in FR50-M *versus* CONT-M rats ($P<0.01$, Fig. 5D-E) and in FR50-F *versus* CONT-F rats by 90.59%,

in relation to respective counterparts ($P < 0.05$, Fig. 5D-E). The comparison between CONT-F *versus* CONT-M and between FR50-F *versus* FR50-M groups did not display statistical difference ($P > 0.05$, Fig. 5D-E).

At 120 days-old, the fast glycemia of rats FR50-M was 11.48% higher than CONT-M rats ($P < 0.05$, Fig. 5F), but it did not differ between FR50-F *versus* CONT-F rats ($P > 0.05$, Fig. 5F). While fast glycemia did not differ between CONT-F *versus* CONT-M ($P > 0.05$, Fig. 5F) it was 12.38% smaller in FR50-F when compared to FR50-M rats ($P < 0.01$, Fig. 5F).

At 120 days-old, the AUC of glycemia from FR50-M rats remained smaller than CONT-M rats (22.58%, $P < 0.05$, Fig. 5G-H), and reduced by 23.39% in FR50-F rats compared to CONT-F rats ($P < 0.05$, Fig. 5G-H). The AUC of glycemia during the ipGTT was not statistical difference between CONT-F *versus* CONT-M and between FR50-F *versus* FR50-M rats ($P > 0.05$, Fig. 5G-H). The Kitt remained increased in both undernourished rats, it was 225.00% higher in FR50-M *versus* CONT-M ($P < 0.01$, Fig. 5I-J) and by 166.44% in FR50-F *versus* CONT-F group ($P < 0.05$, Fig. 5I-J). The comparison between CONT-F *versus* CONT-M and between FR50-F *versus* FR50-M groups did not show statistical difference ($P > 0.05$, Fig. 5I-J).

Liver and iBAT redox status assessment

At 60 days-old, the redox status of the SOD and CAT biomarkers in liver ($P > 0.05$, Fig. 6A-B), as well as the SOD and GSH in iBAT ($P > 0.05$, Fig. 6G and I) did not differ among groups and sex.

At the same age, when compared to CONT-M, the liver's GSH levels increased by 121.14% in FR50-M group ($P < 0.05$, Fig. 6C) and, in relation to CONT-F, it increased by 195.88% in FR50-F ($P < 0.001$, Fig. 6C). The liver's GSH levels did not differ between CONT-F *versus* CONT-M and between FR50-F *versus* FR50-M ($P > 0.05$, Fig. 6C). In turn, the levels of CAT in the iBAT of FR50-M did not differ from CONT-M ($P > 0.05$, Fig. 6H) but increased by 52.41% in FR50-F in comparison with CONT-F ($P < 0.001$, Fig. 6H). The levels of CAT in iBAT from CONT-F *versus* CONT-M and from FR50-F *versus* FR50-M were not statistically different ($P > 0.05$, Fig. 6H).

At 120 days-old, the levels of SOD in liver did not differ among groups ($P > 0.05$, Fig. 6D). Regarding the CAT levels in liver, they were reduced by 37.30% in FR50-M compared to CONT-M ($P > 0.01$, Fig. 6E), while there was no statistical difference between FR50-F *versus* CONT-F ($P < 0.05$, Fig. 6E), as well as between CONT-F *versus* CONT-M ($P > 0.05$, Fig. 6E). In comparison to FR50-M rats, the levels of CAT in the liver from FR50-F were augmented by 66.70% ($P < 0.01$, Fig. 6E). While we did not observe statistical difference among the levels of GSH in the liver of FR50-M *versus* CONT-M, FR50-F *versus* CONT-F and between FR50-F *versus* FR50-M ($P > 0.5$, Fig. 6F), the liver's GSH levels of CONT-F were reduced by 32.73 when compared to CONT-M group ($P < 0.001$, Fig. 6F).

At 120 days-old, the activity of SOD in iBAT from FR50-M rats reduced by 32.22% in relation to CONT-M ($P < 0.01$, Fig. 6J), but it did not differ between FR50-F *versus* CONT-F, as well as between CONT-F *versus* CONT-M and between FR50-F *versus* FR50-F ($P > 0.05$, Fig. 6J). The iBAT's CAT activity was reduced by 33.36% in FR50-M group compared to CONT-M ($P < 0.01$, Fig. 6K) and by 26.50% in FR50-F group compared to CONT-F ($P < 0.05$, Fig. 6K). There was no significant difference between CONT-M *versus* CONT-F and between FR50-F *versus* FR50-M ($P > 0.05$, Fig. 6K).

Regarding the iBAT's GSH levels at 120 days-old, it increased by 88.53% in FR50-M rats in relation to CONT-M ($P < 0.05$, Fig. 6L), while statistical differences were not observed between FR50-F *versus* CONT-F and between CONT-F *versus* CONT-M ($P > 0.05$, Fig. 6L). The levels fo GSH in iBAT of FR50-F rats were 47.79% smaller than FR50-M ($P < 0.05$, Fig. 6L).

Discussion

In the current study we demonstrate that undernutrition during adolescence affects body composition, leading to high food consumption and an associated rapid catch-up growth in male and female rats. In addition, the lean phenotype displayed as short-term effect is not observed as long-term effect, putting out these rats at a high risk for developing obesity in later life. Regarding the increased adiposity observed as long-term effect undernourished rats during adolescence, animals did not ingest adequate amount of nutrients leading to weight loss. It is suggestive that chronic hunger must have triggered a stimulus that may have modulated endocrine changes (Griffin 2015; Qiu et al. 2010) in these rats leading to intake food and gain body weight throughout life, even slightly it can gradually contribute to fat accumulation, especially if associated to high insulin sensitivity.

During fasting, as well as chronic hunger conditions, as herein in the present study, the level of ghrelin increases and leptin decreases, which increases appetite by stimulating hypothalamic NPY/AgRP neurons, and increasing growth hormone (GH) secretion that acts on hepatic tissue. Regarding hunger condition, hepatic tissue develops GH resistance to avoid insulin growth factor type 1 (IGF-1) hypersecretion and its over stimulation in peripheral tissues (Won and Borski 2013). During the nutritional recovery period, when the animals were once again given *ad libitum* food, as expected, greater food intake was observed in both sexes, since at this stage the rats that were subjected to malnutrition have altered metabolism due to the period of malnutrition. Thus, they tend to eat more and consequently gain more weight, as a physiological effect to try to recover the caloric deficiency (de Wit, et al. 2013). However, when the effect of malnutrition affects more gene transcription factors, this can lead to delayed recovery, which can contribute to the development of obesity in the long term.

As known, at chronic starvation period, there is reduced phosphorylation and acetylation of STAT (Yamamoto, et al. 2013), increased production of FGF-21 (Contreras, et al. 2013) and decreased IGF-1 (Breier 1999), as well as increased SIRT-1 activity, leading to deacetylation and inactivation of STAT3, and deacetylation and degradation of SREBP-1, reducing lipogenesis and cholesterol synthesis (Chalkiadaki and Guarente 2012).

Among other possible explanations, during the period of free food supply, immediately after malnutrition, the catch-up results from two apparently conflicting actions associated with the action of GH and ghrelin (Won and Borski 2013), since in this period hepatic resistance to GH ends and the elevated GH levels result in elevated IGF-1 levels that act on target tissues to promote higher than normal protein synthesis and cell division, leading to a catch-up. Gradually, leptin production increases as adipose stores increase, which leads to greater inhibition of central GH production. At the same time, ghrelin secretion falls and further decreases GH secretion (Won and Borski 2013).

Data derived from clinical studies relating obesity and oxidative stress have established a correlation between oxidative stress biomarkers and high body mass indexes (Sankhla, et al. 2012; Vincent and Taylor 2006). Unlike what was seen in male rats subjected to protein malnutrition during adolescence (de Oliveira et al. 2013; de Oliveira et al. 2018), in the present study, glucose intolerance and insulin resistance were not observed. As has already been shown in the literature, malnutrition is defined by an inadequate intake of nutrients such as proteins, vitamins and minerals (de Onis, et al. 1993), resulting in the organism's inability to meet the demand necessary for growth, development and maintenance of specific functions in a

physiological way, thus increasing the predisposition to the appearance and/or progression of metabolic diseases (de Onis et al. 1993), inducing diverse effects throughout life (Ribeiro, et al. 2012).

Our results show that the animals that were malnourished in adolescence present a greater tolerance to glucose, as well as a greater peripheral sensitivity to inulin, in both sexes, although the males had fasting hyperglycemia at 120 days old. This shows that the rats that were malnourished have a high peripheral sensitivity to insulin, a fact that suggests the hypothesis that there is a participation of fast-acting counter-regulatory hormones (glucagon and/or adrenaline) in the control of glycemic homeostasis in this animal model of malnutrition. Studies show that mice treated for 8 weeks with a low-protein diet present a greater production of hepatic glycogen, which has been associated with increased hepatic sensitivity to insulin (Marroqui, et al. 2012).

The results obtained in the present study show that malnutrition was able to modulate the antioxidant system in brown adipose tissue, without causing major effects on the liver. Our data show a reduction in the activities of SOD, CAT and GST in the brown adipose tissue of male rats and a reduction in the activities of SOD and CAT in the brown adipose tissue of control rats, suggesting oxidative damage to the thermogenic system of male and female rats at 120 days old, respectively. The imbalance between the formation and removal of reactive oxygen species in the body, resulting from the decrease in endogenous antioxidants or the increase in the generation of oxidant species, generates a pro-oxidant state that favors the occurrence of oxidative damage in macromolecules and cellular structures, which can result in cell death and dysfunction (Halliwell 2012; Sies 1991).

SOD is the first detoxification enzyme and the most powerful antioxidant in the cell (Fridovich 1995), its decrease may be associated with an excessive production of superoxide anion, which results in the formation of other reactive species, including peroxynitrite and the hydroxyl radical, potent inducers of damage to DNA, proteins and lipids (Evans, et al. 2002). On the other hand, since no reduction in these markers was observed in malnourished females, it can be inferred that the females that were malnourished, both at 60 and 120 days old, developed adaptation to the oxidative stress. This adaptation might be given by estrogen, which acts directly as an antioxidant against free radicals (Santanam, et al. 1998).

As a short and long-term effect, hepatomegaly was observed in both sexes, which may be associated with the programming of greater biochemical functionality of the liver due to effects of metabolic stress during malnutrition (Khoury, et al. 2018; Lee, et al. 2016).

As a short-term effect of malnutrition on brown adipose tissue, a reduction in the weight of this tissue was observed. It is also worth mentioning that brown adipose tissue is important for the thermogenic response and energy balance in small mammals, with the main function of oxidizing lipids to produce heat, and is therefore specialized in adaptive thermogenesis (Himms-Hagen 1990). Diet can also activate brown adipose tissue in a similar manner (diet-induced thermogenesis), this activity influences feeding behavior and energy balance, consequently transgenic mice lacking brown adipose tissue develop obesity (Cinti 2006).

Several studies have been published in animal models showing that obesity is related to reduced activity of brown adipose tissue. Among these models we can mention those with genetic alteration such as *fa/fa* mice (Chua, et al. 1996; Phillips, et al. 1996), *db/db* mice (Romsos 1981; Tschop and Heiman 2002) and animals with monosodium glutamate-induced obesity (Morris,

et al. 1998; Nagata, et al. 2006).

Regarding the low weight of the soleus muscle in males, it is suggested that malnutrition in adolescence acts as an imbalance factor, causing changes in the tissues and structures of the organs. Skeletal muscle tissue is sensitive to protein malnutrition because it is a protein reservoir in the body. Therefore, when there is a protein deficit in the diet, this tissue becomes a target for depletion (Ihemelandu 1985). In the present study, the result corroborates a previous study which showed that protein malnutrition reduced the weight of muscle tissue (Rowe 1968), which may have probably occurred due to the loss of tissue proteins. In our study, as a long-term effect, no reduction in lean mass was observed in females, but there was a reduction in lean mass in males. This may be due to the presence of sex hormones (estrogens) in females, which serve as protection in the regulation of body weight and energy expenditure.

Our data support the hypothesis that undernutrition during adolescence programs greater visceral adiposity, peripheral hypersensitivity to insulin both in males and females. It was also concluded that malnutrition during adolescence was able to induce less redox protection in the thermogenic tissue of male rats. On the other hand, it was possible to observe that females, regardless of nutritional stress, presented increased defenses against reactive oxygen species. In analyzing the set of results presented in this work, it is worth mentioning that the way in which metabolism reacts to caloric restriction (chronic hunger) shows that any form of malnutrition should be avoided, not only in adolescents, but in people in general, because when in a critical phase of development, the result of malnutrition can be surprising and devastating.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Funding

This work was supported by the Brazilian Federal Research Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Master student fellowship, 88887.653586/2021-00).

Author's Contribution

J.S.P. and J.C.O. conceived and designed the study; J.S.P., A.J.R.R., A.C.S.K., M.O.S., T.C.S., K.P.S., A.M.D.R., M.F.A. and I.Z.F. collected and analyzed data; J.C.O. and J.S.P. wrote the manuscript; J.S.P., A.J.L.B.F. and V.D.G. contributed to the redox status assessment and analyses; V.D.G.S., R.A.M.L.N. and J.C.O. contributed to the discussion, and reviewed the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

References

1. Barker DJ 2004 The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* **93** 26-33.
2. Breier BH 1999 Regulation of protein and energy metabolism by the somatotrophic axis. *Domest Anim Endocrinol* **17** 209-218.
3. Chalkiadaki A & Guarente L 2012 Sirtuins mediate mammalian metabolic responses to nutrient availability. *Nat Rev Endocrinol* **8** 287-296.
4. Chua SC, Jr., Chung WK, Wu-Peng XS, Zhang Y, Liu SM, Tartaglia L & Leibel RL 1996 Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor. *Science* **271** 994-996.
5. Cinti S 2006 The role of brown adipose tissue in human obesity. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **16** 569-574.
6. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A & Dalle-Donne I 2016 A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1019** 178-190.
7. Contreras AV, Torres N & Tovar AR 2013 PPAR-alpha as a key nutritional and environmental sensor for metabolic adaptation. *Adv Nutr* **4** 439-452.
8. de Oliveira JC, Lisboa PC, de Moura EG, Barella LF, Miranda RA, Malta A, Franco CC, Ribeiro TA, Torrezan R, Gravena C, et al. 2013 Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. *J Endocrinol* **216** 195-206.
9. de Oliveira JC, de Moura EG, Miranda RA, de Moraes AMP, Barella LF, da Conceicao EPS, Gomes RM, Ribeiro TA, Malta A, Martins IP, et al. 2018 Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. *J Endocrinol* **237** 243-254.
10. de Onis M, Monteiro C, Akre J & Glugston G 1993 The worldwide magnitude of protein-energy malnutrition: an overview from the WHO Global Database on Child Growth. *Bull World Health Organ* **71** 703-712.
11. de Wit CC, Sas TC, Wit JM & Cutfield WS 2013 Patterns of catch-up growth. *J Pediatr* **162** 415-420.
12. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA & Grodsky GM 2002 Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* **23** 599-622.
13. Ferroni NM, Chertoff MJ, Alberca CD, Berardino BG, Gianatiempo O, Brahamian M, Levi V, Urrutia L, Falasco G, Canepa ET, et al. 2023 Oxidative stress associated with spatial memory impairment and social olfactory deterioration in female mice reveals premature aging aroused by perinatal protein malnutrition. *Exp Neurol* **368** 114481.
14. Fridovich I 1995 Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem* **64** 97-112.
15. Griffin IJ 2015 Catch-Up Growth: Basic Mechanisms. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* **81** 87-97.
16. Halliwell B 2012 Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev* **70** 257-265.
17. Himms-Hagen J 1990 Brown adipose tissue thermogenesis: interdisciplinary studies. *FASEB J* **4** 2890-2898.
18. Ihemelandu EC 1985 Fibre number and sizes of mouse soleus muscle in early postnatal protein malnutrition. *Acta Anat (Basel)* **121** 89-93.
19. Khoury J, Zohar Y, Shehadeh N & Saadi T 2018 Glycogenic hepatopathy. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* **17** 113-118.

20. Lee J, Choi J, Scafidi S & Wolfgang MJ 2016 Hepatic Fatty Acid Oxidation Restrains Systemic Catabolism during Starvation. *Cell Rep* **16** 201-212.
21. Lundbaek K 1962 Intravenous glucose tolerance as a tool in definition and diagnosis of diabetes mellitus. *Br Med J* **1** 1507-1513.
22. Malta A, de Moura EG, Ribeiro TA, Tofolo LP, Abdennebi-Najar L, Vieau D, Barella LF, de Freitas Mathias PC, Lisboa PC & de Oliveira JC 2016 Protein-energy malnutrition at mid-adulthood does not imprint long-term metabolic consequences in male rats. *Eur J Nutr* **55** 1423-1433.
23. Malta A, de Oliveira JC, Ribeiro TA, Tofolo LP, Barella LF, Prates KV, Miranda RA, Elmhiri G, Franco CC, Agostinho AR, et al. 2014 Low-protein diet in adult male rats has long-term effects on metabolism. *J Endocrinol* **221** 293-303.
24. Marroqui L, Batista TM, Gonzalez A, Vieira E, Rafacho A, Colleta SJ, Taboga SR, Boschero AC, Nadal A, Carneiro EM, et al. 2012 Functional and structural adaptations in the pancreatic alpha-cell and changes in glucagon signaling during protein malnutrition. *Endocrinology* **153** 1663-1672.
25. Mathias PCF, Miranda GDS, Barella LF, Miranda RA, Pavanello A, Martins IP, Facchi JC, Costermani HO, Lima TAL & de Oliveira JC 2020 Cholinergic-pathway-weakness-associated pancreatic islet dysfunction: a low-protein-diet imprint effect on weaned rat offspring. *J Dev Orig Health Dis* **11** 484-491.
26. Morris MJ, Tortelli CF, Filippis A & Proietto J 1998 Reduced BAT function as a mechanism for obesity in the hypophagic, neuropeptide Y deficient monosodium glutamate-treated rat. *Regul Pept* **75-76** 441-447.
27. Nagata M, Suzuki W, Iizuka S, Tabuchi M, Maruyama H, Takeda S, Aburada M & Miyamoto K 2006 Type 2 diabetes mellitus in obese mouse model induced by monosodium glutamate. *Exp Anim* **55** 109-115.
28. Nelson DP & Kiesow LA 1972 Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem* **49** 474-478.
29. Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, et al. 2020 Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol* **18** e3000411.
30. Phillips MS, Liu Q, Hammond HA, Dugan V, Hey PJ, Caskey CJ & Hess JF 1996 Leptin receptor missense mutation in the fatty Zucker rat. *Nat Genet* **13** 18-19.
31. Qiu X, Brown K, Hirschey MD, Verdin E & Chen D 2010 Calorie restriction reduces oxidative stress by SIRT3-mediated SOD2 activation. *Cell Metab* **12** 662-667.
32. Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ & Bleker OP 1999 Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* **70** 811-816.
33. Ribeiro RA, Santos-Silva JC, Vettorazzi JF, Cotrim BB, Mobiolli DD, Boschero AC & Carneiro EM 2012 Taurine supplementation prevents morpho-physiological alterations in high-fat diet mice pancreatic beta-cells. *Amino Acids* **43** 1791-1801.
34. Romsos DR 1981 Efficiency of energy retention in genetically obese animals and in dietary-induced thermogenesis. *Fed Proc* **40** 2524-2529.
35. Rowe RW 1968 Effect of low nutrition on size of striated muscle fibres in the mouse. *J Exp Zool* **167** 353-358.
36. Sankhla M, Sharma TK, Mathur K, Rathor JS, Butolia V, Gadhok AK, Vardey SK, Sinha M & Kaushik GG 2012 Relationship of oxidative stress with obesity and its role in obesity induced metabolic syndrome. *Clin Lab* **58** 385-392.

37. Santanam N, Shern-Brewer R, McClatchey R, Castellano PZ, Murphy AA, Voelkel S & Parthasarathy S 1998 Estradiol as an antioxidant: incompatible with its physiological concentrations and function. *J Lipid Res* **39** 2111-2118.
38. Sies H 1991 Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* **91** 31S-38S.
39. Tschop M & Heiman ML 2002 Overview of rodent models for obesity research. *Curr Protoc Neurosci* **Chapter 9** Unit 9 10.
40. Uauy R, Kain J & Corvalan C 2011 How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? *Am J Clin Nutr* **94** 1759S-1764S.
41. Vincent HK & Taylor AG 2006 Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. *Int J Obes (Lond)* **30** 400-418.
42. Won ET & Borski RJ 2013 Endocrine regulation of compensatory growth in fish. *Front Endocrinol (Lausanne)* **4** 74.
43. WHO. World Health Organization. Malnutrition, 2024. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition/>. Accessed at 11/26/2024.
44. Xue Y, Guo C, Hu F, Zhu W & Mao S 2020 Undernutrition-induced lipid metabolism disorder triggers oxidative stress in maternal and fetal livers using a model of pregnant sheep. *FASEB J* **34** 6508-6520.
45. Yamamoto M, Iguchi G, Fukuoka H, Suda K, Bando H, Takahashi M, Nishizawa H, Seino S & Takahashi Y 2013 SIRT1 regulates adaptive response of the growth hormone--insulin-like growth factor-I axis under fasting conditions in liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110** 14948-14953.

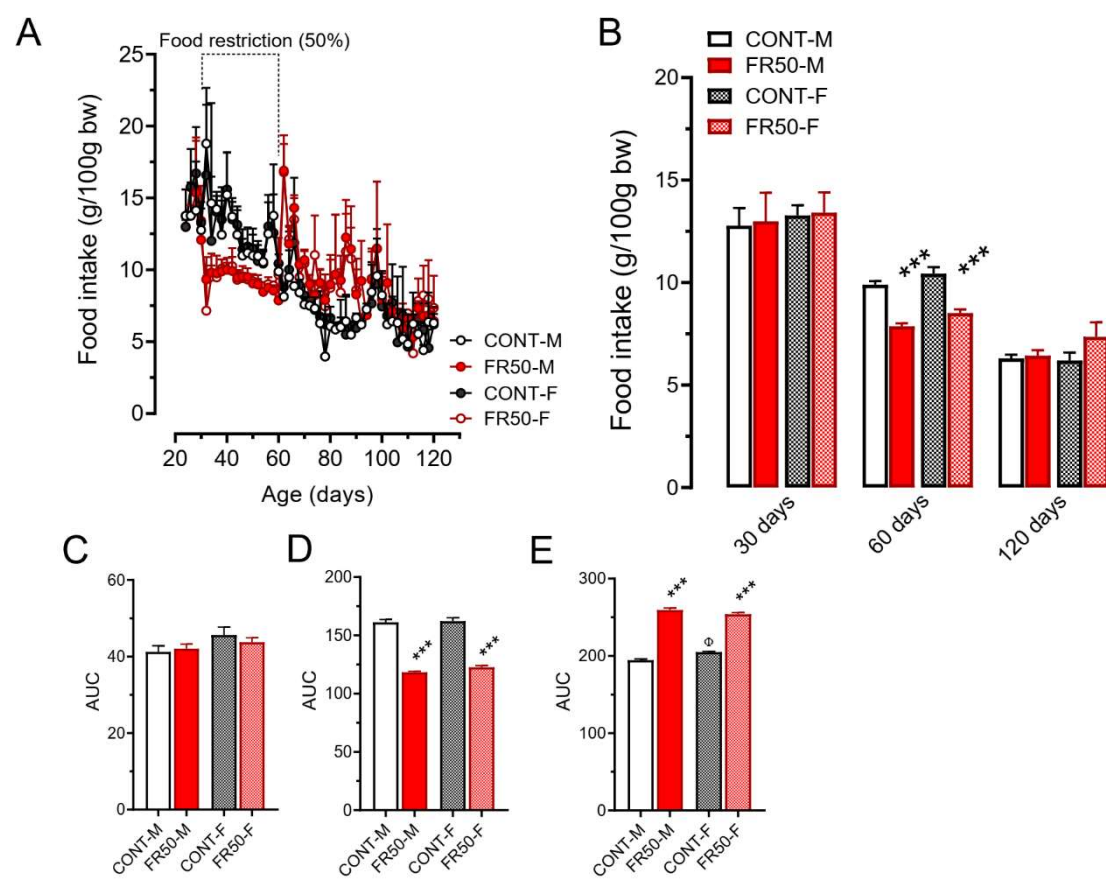
Figure 1.

Figure 2.

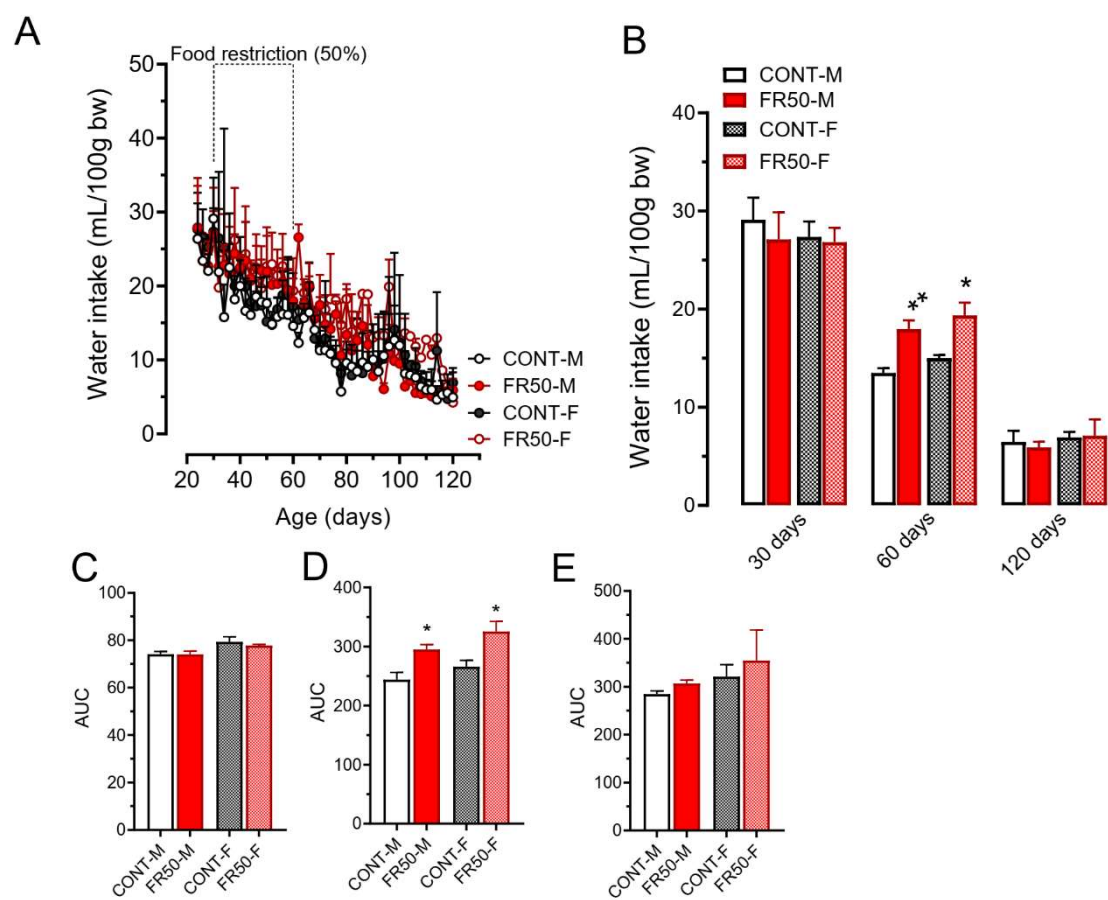


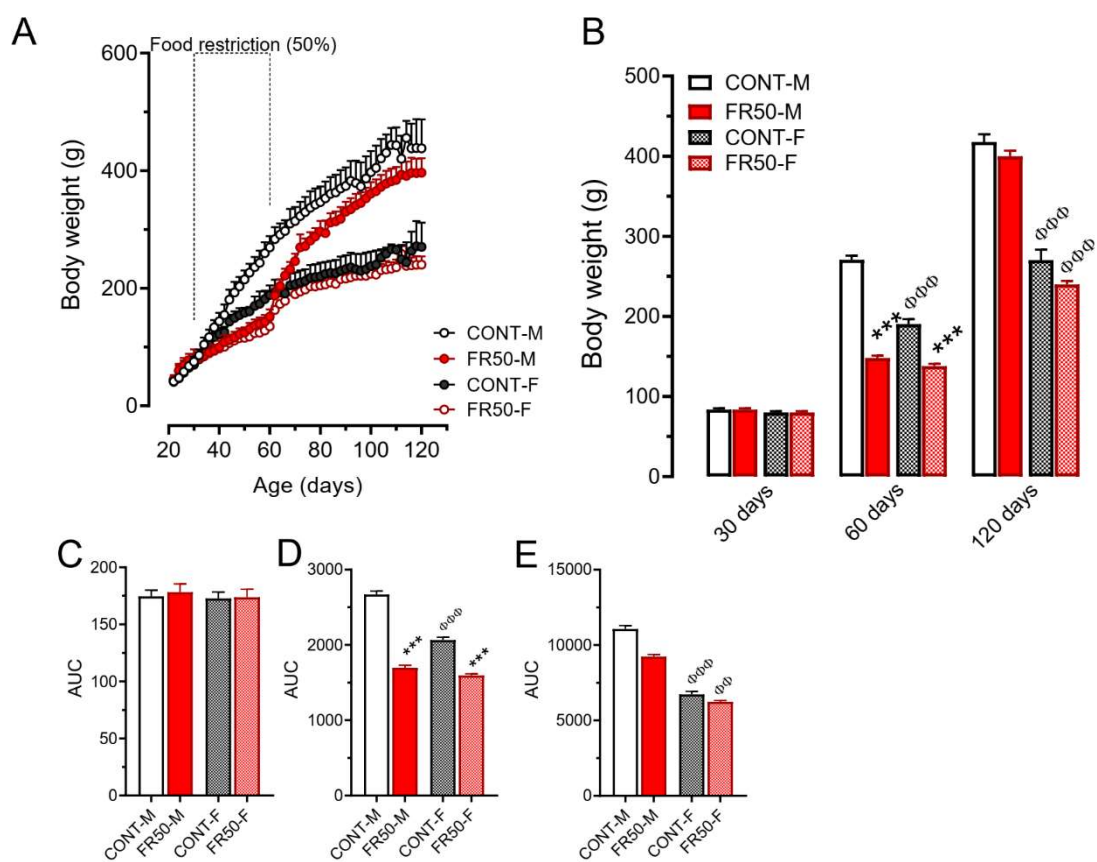
Figure 3.

Figure 4.

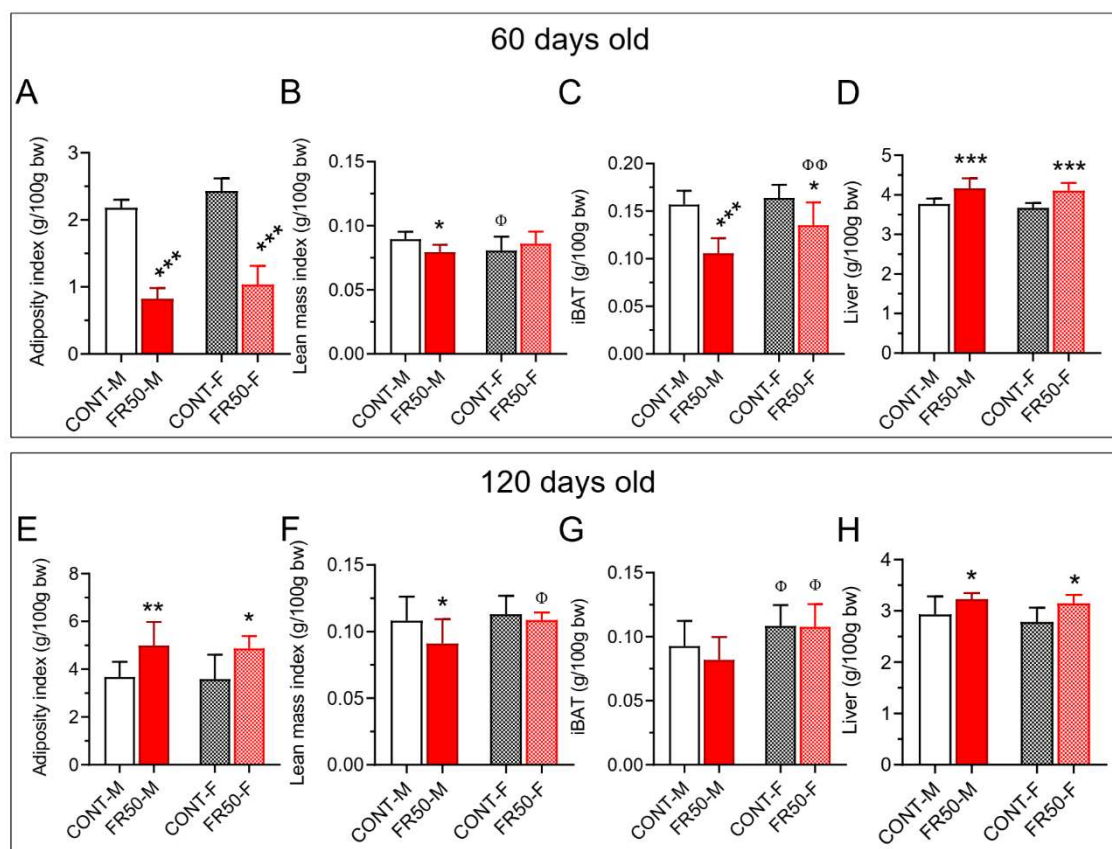


Figure 5.

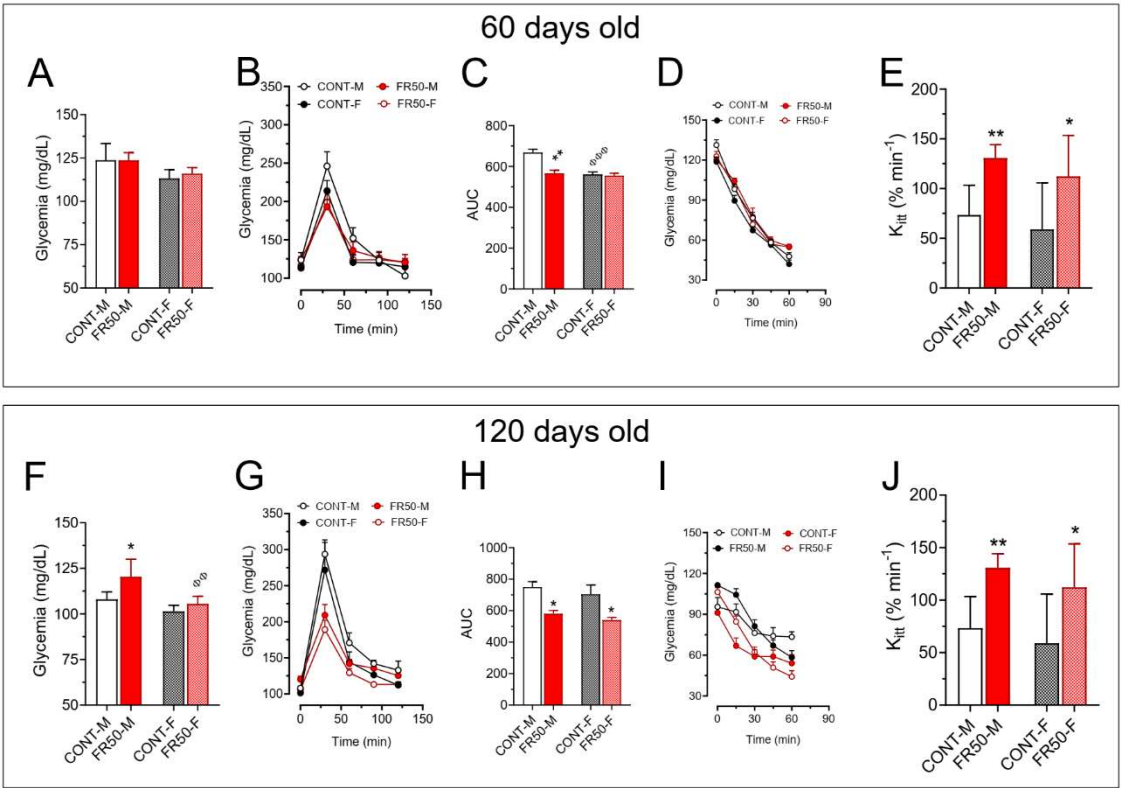


Figure 6.

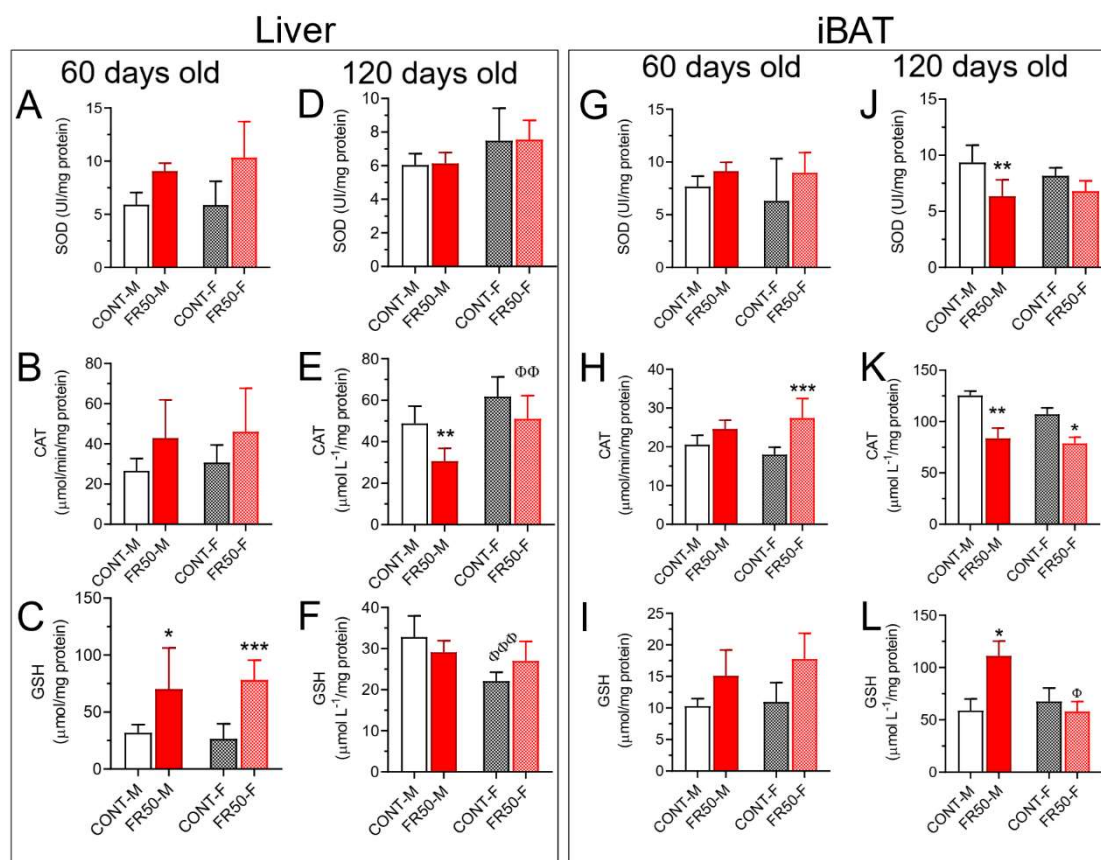


Figure Legends

Figure 1. Food intake throughout experimental period (A) and at 30, 60 and 120 days-old (B). Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=4$ litters). The area under the curve (AUC) for each period of dietary treatment are presented in figure C (before undernutrition, from 22 to 30 days-old), figure D (during undernutrition, 30 to 60 days-old) and figure E (after undernutrition, from 60 to 120 days-old). Symbol *** $P<0.001$ depicts comparison between CONT *versus* FR50 and $^{\Phi}P<0.05$ depicts comparison between male (M) *versus* female (F) using one way ANOVA followed by Tukey's post-test. CONT-M, control group of male rats; CONT-F, control group of female rats; FR50-M, undernourished group of male rats; FR50-F, undernourished group of female rats.

Figure 2. Drinking water consumption throughout experimental period (A) and at 30, 60 and 120 days-old (B). Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=4$ litters). The area under the curve (AUC) for each period of dietary treatment are presented in figure C (before undernutrition, from 22 to 30 days-old), figure D (during undernutrition, 30 to 60 days-old) and figure E (after undernutrition, from 60 to 120 days-old). Symbol * $P<0.05$, ** $P<0.01$ depicts comparison between CONT *versus* FR50 using one way ANOVA followed by Tukey's post-test. CONT-M, control group of male rats; CONT-F, control group of female rats; FR50-M, undernourished group of male rats; FR50-F, undernourished group of female rats

Figure 3. Body weight gain throughout experimental period (A) and at 30, 60 and 120 days-old (B). Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=16$ rats). The area under the curve (AUC) for each period of dietary treatment are presented in figure C (before undernutrition, from 22 to 30 days-old), figure D (during undernutrition, 30 to 60 days-old) and figure E (after undernutrition, from 60 to 120 days-old). Symbol *** $P<0.001$ depicts comparison between CONT *versus* FR50 and $^{\Phi\Phi}P<0.01$, $^{\Phi\Phi\Phi}P<0.001$ depicts comparison between male (M) *versus* female (F) using one way ANOVA followed by Tukey's post-test. CONT-M, control group of male rats; CONT-F, control group of female rats; FR50-M, undernourished group of male rats; FR50-F, undernourished group of female rats.

Figure 4. Short- and long-term effects of pubertal undernutrition on body composition. Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=16$ rats). The short-term effect is shown in the figures A–D and long-term effect in the figures E–H. Symbols * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ depicts comparison between CONT *versus* FR50 and $^{\Phi}P<0.05$, $^{\Phi\Phi}P<0.01$ depicts comparison between male (M) *versus* female (F) using one way ANOVA followed by Tukey's post-test. CONT-M, control group of male rats; CONT-F, control group of female rats; FR50-M, undernourished group of male rats; FR50-F, undernourished group of female rats.

Figure 5. Short- and long-term effects of pubertal undernutrition on glucose-insulinemia homeostasis. Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=8$ rats). The fasting glycemia is shown in figure A (at 60 days-old) and figure F (at 120 days-old). The area under the curve (AUC) of the ipGTT is shown in figure C for rats at 60 days-old and in figure H for rats at 120 days-old. The short-term effect is shown in the figures A–D and long-term effect in the figures E–H.

Symbols $*P<0.05$, $**P<0.01$ depicts comparison between CONT *versus* FR50 and $^{\Phi}P<0.01$, $^{\Phi\Phi}P<0.001$ depicts comparison between male (M) *versus* female (F) using one way ANOVA followed by Tukey's post-test. CONT-M, control group of male rats; CONT-F, control group of female rats; FR50-M, undernourished group of male rats; FR50-F, undernourished group of female rats.

Figure 6. Short- and long-term effects of pubertal undernutrition on the liver and iBAT redox status. Data are presented as the means $\pm$ SD ($n=8$ rats). The short-term effect is shown in the figures A–C (for liver) and in the figures G–I (for iBAT) and the long-term effect in the figures D–F (for liver) and in the figures J–L (for iBAT). Symbols $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$ depicts comparison between CONT *versus* FR50 and $^{\Phi}P<0.05$, $^{\Phi\Phi}P<0.01$, $^{\Phi\Phi\Phi}P<0.001$ depicts comparison between male (M) *versus* female (F) using one way ANOVA followed by Tukey's post-test. CONT-M, control group of male rats; CONT-F, control group of female rats; FR50-M, undernourished group of male rats; FR50-F, undernourished group of female rats.