UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE NUTRIÇÃO JOSUÉ DE CASTRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

Julia Geminiani Andrade Baptista

JEJUM INTERMITENTE NA GESTAÇÃO DE RATAS E CONSEQUÊNCIA SOBRE MARCADORES DE OBESIDADE MATERNA E NA PROLE MACHO.

Macaé
2018

Julia Geminiani Andrade Baptista

JEJUM INTERMITENTE NA GESTAÇÃO DE RATAS E CONSEQUÊNCIA SOBRE MARCADORES DE OBESIDADE MATERNA E NA PROLE MACHO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Nutrição Humana.

Orientadoras:

Profª Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha e Profª Kelse Tibau de Albuquerque

Macaé
2018

Julia Geminiani Andrade Baptista

JEJUM INTERMITENTE NA GESTAÇÃO DE RATAS E CONSEQUÊNCIA SOBRE MARCADORES DE OBESIDADE MATERNA E NA PROLE MACHO.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição (PPGN), do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Nutrição Humana.

Data da aprovação: _____ de _____ de _____

_____

Profª Drª Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha

_____

Profº Drº Leandro Olivera Batista

_____

Profª Drª Elisa Maria de Aquino Lacerda

_____

Profª Drª Vivian de Oliveira Sousa Corrêa

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela oportunidade de realizar este sonho. Por me fazer entender que tudo acontece no tempo Dele. Agradeço ao mestre Jesus e à espiritualidade amiga que cuidaram de mim e dos meus entes queridos. Que foram o refúgio e me mostraram os caminhos para conciliar as adversidades do período. Além, é claro, da força e coragem de trabalhar pela primeira vez com modelo animal.

Agradeço à minha orientadora Kelse Tibau de Albuquerque por mudar a minha vida! Por me reapresentar um universo de possibilidades que eu, há algum tempo, havia esquecido que existia. Agradeço por me estimular a crescer, por dividir o conhecimento, pelas conversas nas noites de insônia via whatsapp, por puxar a orelha. Agradeço ainda, por toda a humanidade e compreensão nos momentos difíceis.

Agradeço à minha orientadora Fátima Lúcia de Carvalho Sardinha, professora que admiro profundamente desde a graduação. Que me deu todo o suporte necessário nos contratempos. Que foi o alicerce junto ao PPGN e não hesitou em me ajudar. Agradeço de todo o coração!

Agradeço a equipe de técnicos do laboratório e biotério por toda assistência. Agradeço, em especial, ao professor Leandro, por ter paciência em me explicar, repetidamente, todas as análises, reagentes, etapas e os seus porquês e depois me reexplicar tudo outra vez e quantas vezes fosse necessário! Agradeço pela atenção à cada detalhe e comentário na revisão deste trabalho.

Aos meus amigos de laboratório, além do agradecimento, desejo as maiores conquistas. A força e dedicação que assisti, diariamente, de cada um de vocês foram grandes exemplos. Em particular, agradeço à Vivi, companheira, que me supervisionou e corrigiu durante as análises, que se preocupava e ajudava sempre. Me instruindo de perto ou mesmo distante. Obrigada por estar ali quando eu precisei! Você merece o que há de melhor!

Às alunas de IC que compartilharam este projeto comigo, Carolina e Rayane! Vocês foram as melhores parceiras! A harmonia do nosso trabalho foi além do compromisso com as análises e experimentos, contribuíamos umas com as outras por carinho, por respeito. Obrigada por cada momento juntas! Vocês moram no meu coração!

À minha família, agradeço pelo apoio, por compreender minha ausência. Foram muitos os meses nos quais tivemos pouco contato, mas saber que vocês estão sempre ali por mim faz toda a diferença. Em especial à minha mãe Magda, irmã Nicole, amiga-irmã-comadre Luciana e à minha sogra Roziane, obrigada por me ouvirem quando eu precisava desabafar, amo vocês!

Ao meu maior companheiro, Igor! Não foram anos fáceis, agradeço a sua presença ao meu lado. Sei que ao longo da vida ainda nos aguardam novas batalhas, mas as alegrias que nos esperam serão inúmeras. Peço a Deus que saibamos tirar o melhor proveito de cada nova etapa para que a nossa união sempre se fortaleça. Te amo!

“Se você tem um sonho, você
pode transformá-lo em realidade!
Lembre-se sempre que tudo isso
começou com um sonho e um rato”

Walt Disney

RESUMO

O ambiente intrauterino é um fator determinante para a saúde fetal e pode determinar programação metabólica na prole devido à déficits nutricionais maternos, resultando no desenvolvimento de doenças crônicas na vida adulta. A prática do jejum intermitente (JI) tem se popularizado, incluindo mulheres na gestação que buscam controlar o ganho de massa corporal nesta fase. Contudo, poucas são as evidências científicas acerca do efeito deste comportamento alimentar sobre desfechos maternos e aos descendentes. O JI consistiu na restrição de 60% da ração consumida pelos controles (C) em dias alternados, sendo 1 dia de livre acesso ao consumo:1 dia restrito. Para tanto, ratas prenhas (n=10) foram submedidas à JI conforme protocolos experimentais dos quatro grupos: controle (C), restritos na primeira (R1) e na segunda (R2) metade da gestação e na gestação inteira (RI). Foram avaliados nas ratas o ganho de massa corporal, consumo alimentar, adiposidade visceral e marcadores bioquímicos. Na prole macho verificamos, após a lactação, parâmetros nutricionais e aos 100 dias analisamos a adiposidade, marcadores bioquímicos, o teor da proteína fosfo-Akt, expressão gênica de FoxO 1 no hipotálamo e a resposta hipotalâmica à infusão intracerebroventricular de insulina. Os resultados evidenciaram hiperfagia materna nos dias pós restrição e obesidade visceral em todos os grupos submetidos ao JI. As proles apresentaram resistência à ação periférica e central da insulina. Concluímos que o JI na gestação propiciou alterações que contribuem para o desenvolvimento da obesidade materna e fetal.

Palavras chave: jejum intermitente; programação metabólica; gestação; fosfo-Akt, FoxO 1; infusão intracerebroventricular.

ABSTRACT

The intrauterine environment is a determinant factor for fetal health and can determine metabolic programming in the offspring due to maternal nutritional deficits, resulting in the development of chronic diseases in adult life. The practice of intermittent fasting (IF) has become popular, including women in gestation who seek to control body mass gain at this stage. However, there is little scientific evidence on the effect of feeding behavior on maternal and offspring outcomes. IF consisted of restriction to 60% of the diet consumed by controls (C) on alternate days, being day 1 free: 1 day restricted. Therefore, pregnant rats (n=10), were subjected to intermittent fasting according to the experimental protocols of the four groups: control (C), restricted in the first (R1) and second (R2) half of gestation and in whole gestation. Weight gain, dietary intake, visceral adiposity and biochemical markers were evaluated in the pregnant rats. In the male offspring, we observed nutritional parameters after lactation and at 100 days we analyzed adiposity, biochemical markers, phospho-Akt protein content and FoxO 1 gene expression in the hypothalamus and the hypothalamic response to intracerebroventricular infusion of insulin. The results showed maternal hyperphagia on the days post restriction and visceral obesity in all groups submitted to intermittent fasting. The offspring presented resistance to peripheral and central insulin action. We conclude that IF during pregnancy led to changes that contribute to the development of maternal and fetal obesity.

Key words: Intermittent fasting; fetal programming; gestation; Phospho-Akt; FoxO 1; intracerebroventricular infusion.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 Circuitos hipotalâmicos e transdução dos sinais dos mecanismos envolvidos na homeostase energética. Ao se ligar em seu receptor a insulina ativa a via fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) que possibilita a fosforilação da proteína Akt. Uma vez fosforilada, a Akt inibe o fator de transcrição *forkhead box protein* 1 (FoxO 1), responsável pela transcrição gênica de neuropeptídios orexígenos. Adaptado de KOVALENCO (2013). 22

Material e métodos

Figura 2 Desenho experimental 32

Resultados

Artigo 1

Figura 1 Massa corporal inicial e final na gestação 44

Figura 2 Ingestão de ração acumulada na gestação 46

Figura 3 Consumo alimentar no período pós-jejum intermitente 47

Artigo 2

Figura 1 Massa corporal da prole no desmame e ao final do experimento 59

Figura 2 Consumo alimentar semanal 60

Figura 3 Resposta à infusão intracerebroventricular de insulina 64

Figura 4 Teor de fosfo-Akt e expessão do RNAm de FoxO 1 no hipotálamo 65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Material e métodos

Quadro 1	Tempo e temperatura para síntese de cDNA	35
Quadro 2	Parâmetros para a amplificação do mRNA no *StepOne Plus*	36

Artigo 1

Tabela 1	Dados maternos e características da prole ao nascer	45

Artigo 2

Tabela 1	Perfil bioquímico e adiposidade	63

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AgRP	*Agouti-related protein*/Proteína relacionada ao gene agouti
ARC	Núcleo arqueado do hipotálamo
ATP	Adenosina trifosfato
C	Controle
CART	Transcrito regulado pela cocaína e anfetaminas
CT	Colesterol total
DOHaD	*Developmental Origins of Health and Disease*/ Origem do desenvolvimento da saúde e da doença
EPI	Epididimal
FoxO 1	*Forkhead box protein* 1
HbA1c	Hemoglobina glicada
HDL	*High density lipoprotein*/ lipoproteína de alta densidade
HOMA IR	*Homeostatic model assessment: insulin resistance*/ modelo de avaliação da homeostase: resistência insulínica
ICV	Intracerebroventricular
IGF	*Insulin-like growth factor*/ fator de crescimento semelhante a insulina
IRS	Substrato do receptor de insulina
JI	Jejum intermitente
LABNEX	Laboratório de nutrição experimental
LDL	*Low density lipoprotein*/ lipoproteína de baixa densidade
MES	Mesentérico
NPY	Neuropeptídio Y
p-Akt	Akt fosforilada
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5 difosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5 difosfato
PO	Periovariano
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
R1	Grupo restrito primeira metade da gestação
R2	Grupo restrito segunda metade da gestação

RET	Depósito de gordura Retroperitoneal
RI	Grupo restrito gestação integral
SNC	Sistema nervoso central
T3	Triiodotironina
T4	Tiroxina
TRH	Hormônio liberador de tireotrofina
TSH	Hormônio estimulante da tireóide ou tirotrofina
VLDL	*Very low density lipoprotein*/ lipoproteína de muita baixa densidade
VS	Verso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 15
2 REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 Intercorrências gestacionais e implicações materna e fetal 17
2.2 Regulação da ingestão alimentar e obesidade 19
2.3 Ação anorexígena da insulina 21
2.4 Programação metabólica 24
2.5 Jejum intermitente 27
3 OBJETIVOS 30
3.1 Geral 30
3.2 Específicos 30
4 MATERIAL E MÉTODOS 31
4.1 Ética e condições experimentais 31
4.2 Animais e desenho experimental 31
4.3 Avaliação ponderal e do consumo alimentar 32
4.4 Coleta de tecidos 33
4.5 Avaliações plasmáticas 33
4.6 Quantificação hipotalâmica da proteína Akt fosforilada (p-Akt) 33
4.7 Análise da expressão gênica de FoxO 1 34
4.8 Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular (icv) de insulina 36
4.9 Análise estatística 37
5 RESULTADOS 38
5.1 Artigo 1 39
5.1.1 Resumo 39
5.1.2 Introdução 40
5.1.3 Material e métodos 42
5.1.4 Resultados 44
5.1.5 Discussão 48
5.1.6 Referências 51
5.2 Artigo 2 54
5.2.1 Resumo 54
5.2.2 Introdução 55
5.2.3 Material e métodos 57

5.2.4 Resultados 61
5.2.5 Discussão 66
5.2.6 Referências 70
6 CONCLUSÃO 73
7 REFERÊNCIAS 74
ANEXO 81

1 INTRODUÇÃO

A gestação é um período de intensos ajustes anatômicos, fisiológicos e homeostáticos. Estas modificações objetivam a sobrevivência, manutenção do crescimento e desenvolvimento fetal (MEO; HASSAIN, 2016). Consequente à estas adaptações, alterações na estrutura materno-fetal podem provocar prejuízos à organização biológica do concepto com desfechos na vida adulta (BARKER; OSMOND, 1986).

Crescimento insuficiente e má formações são prejuízos que podem ser observados precocemente. Porém, alguns danos podem manifestar-se à longo prazo, sendo detectados apenas na vida adulta (CHARLES; DELPIERRE; BRÉANT, 2016; PORTRAIT; TEEUWISZEN; DEEG, 2011; MILLS, 2017).

Ao final da década de 80, David Barker e seus colaboradores postularam o conceito da origem fetal das doenças. Constataram que situações adversas como privação nutricional crônica durante a gestação, desnutrição materna e inadequações na função placentária promovem alterações metabólicas fetais que favorecem a sobrevivência no curto prazo (CHARLES; DELPIERRE; BRÉANT, 2016). Estas alterações determinam danos metabólicos cujo desdobramento pode ser, entre outros, diabetes, hipertensão, obesidade e doença cardiovascular na vida adulta (BARKER, 1997).

Evidências mostram que um ambiente hostil durante o curso da gestação pode definir prioridades biológicas com vistas ao desenvolvimento de órgãos e funções vitais em condições fisiológicas satisfatórias (GLUCKMAN et al., 2009). O sacrifício imposto a órgãos como fígado, pâncreas, rins e músculos pode desencadear alterações funcionais permanentes, o que resulta em falha na função dos mesmos a longo prazo. Este quadro biológico caracteriza a chamada programação metabólica (WELLS, 2017), uma vez que foram alterações determinadas a partir do ambiente intrauterino.

Embora evidências mostrem que o cérebro seja poupado em ambiente intrauterino desfavoráveis, Ralevski e Horvarth (2015) expuseram a uma série de consequências relacionadas à desnutrição materna, além de apontar que danos no desenvolvimento hipotalâmico podem predispor o organismo fetal à obesidade.

O hipotálamo é o centro integrador de respostas metabólicas que atuam no sistema nervoso central (SNC) sobre a regulação da ingestão alimentar e gasto

energético. Elevações na concentração de insulina plasmática estimulam neurônios hipotalâmicos a promover efeito anorexígeno. (SCHWARTZ et al., 2000).

Durante a gestação, inúmeros fatores modulam a transferência de nutrientes ente mãe e feto. A alimentação e estado nutricional materno são primordiais para o desenvolvimento fetal. Contudo, sintomas clássicos da própria gestação, como as náuseas e vômitos interferem na disponibilidade materna de nutrientes, podendo prejudicar o feto em formação (WHITEHOUSE et al., 2018).

O Ramadan é o jejum total do amanhecer até a alvorada praticado durante um mês a cada ano por mulçumanos e que também expõe as gestantes a uma forma de redução do consumo alimentar (SAVITRI et al., 2014). A participação de mulheres grávidas ao Ramadan é expressiva, embora não existam diretrizes religiosas que versem sobre a adesão ao Ramadan durante a gestação (ALMOND et al., 2008).

O Ramadan, em função dos resultados metabólicos evidenciados em seus participantes, como perda de peso, melhora de perfil lipídico plasmático, foi adaptado por outros grupos da população. Passou a ser utilizado com objetivo de perda ou controle da massa corporal. Atualmente, já é concebido como uma estratégia de perda de peso e passou a ser conhecido como jejum intermitente (JI), que consiste na alternância entre livre acesso ao alimento e restrição total ou parcial em dias ou horas determinados e por período definido livremente (BARNOSKY et al., 2014; CHAUSSE et al., 2014).

Os resultados da utilização desta estratégia dietética são controversos e não há evidências claras para o período gestacional e para a prole. Enquanto em humanos se discute o efeito imediato à saúde ou perda de peso, os modelos animais apontam danos fisiológicos que podem afetar a saúde em longo prazo (RETENTION et al., 2016).

Assim, o intuito deste estudo foi utilizar o JI em ratas grávidas para se reproduzir um modelo que permitisse investigar as implicações da restrição alimentar, imposta de maneira intermitente pela ocorrência de náuseas e vômitos, no período gestacional. Sendo estudados o mecanismo hipotalâmico da via da insulina na prole e o impacto sobre o estado nutricional materno.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Intercorrências gestacionais e implicações à saúde materna e fetal

A saúde materna durante a gestação é foco de atenção. Protocolos e programas de cuidados pré-natais são revisados constantemente no intuito de propiciarem boa evolução da gravidez (LÍBERA et al., 2011).

Mesmo com cuidados e medidas preventivas cada vez mais efetivos, a gestação é um momento de intenso metabolismo e ajustes fisiológicos passíveis de inúmeras disfunções próprias da gestação. Cita-se como exemplo as perturbações no desenvolvimento da própria placenta (BURTON; FOWDEN, 2012).

A nutrição da gestante é importante fator para o prognóstico gestacional (NNAM, 2015). Embora a incidência de mortalidade materna apresente-se em declínio (WHO, 2014), a má nutrição da gestante, principalmente em países em desenvolvimento é, ainda, um fator de risco para a saúde materna, fetal e desfecho gestacional (IMHOFF-KUNSCH; MARTORELL, 2012).

A literatura aponta que o consumo de energia, macronutrientes e micronutrientes como ferro, ácido fólico, cálcio e zinco por gestantes em países em desenvolvimento é menor que o recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ABDEL-HAKEEM et al., 2008). Somado às questões socioeconômicas que limitam o consumo alimentar, há também os sintomas gastrointestinais de náuseas e vômitos, comuns na gestação, que são exemplos de circunstâncias que podem promover redução do consumo de alimentos (CHORTATOS et al., 2013).

As náuseas e vômitos acometem cerca de 35 a 91% das gestantes e, quando muito intensos, caracterizam-se por hiperêmese gravídica (EINARSON; PIWKO; KOREN, 2013), que acomete, aproximadamente, 1,5% das gestações (FIASCHI; NELSON-PIERCY; TATA, 2016; VERBERG et al., 2005). Na hiperêmese, os vômitos são intensos e provocam perda de peso materna, desidratação e desequilíbrio hidroeletrolítico, sendo recorrente a necessidade de internação hospitalar da gestante (CHORTATOS et al., 2013).

Crozier e colaboradores (2016) verificaram que 24% das mulheres com náuseas e vômitos considerados leves relataram redução da ingestão alimentar quando comparado ao consumo antes da gestação. Entre as gestantes com sintomas

moderados e intensos, a proporção de grávidas com redução no consumo alimentar foi ainda maior, sendo 42% e 70%, respectivamente.

Estudos de programação metabólica associam a desnutrição materna a prejuízos no desenvolvimento fetal. A restrição calórica, por exemplo, leva ao aumento de corpos cetônicos circulantes, que são capazes de ultrapassar a barreira placentária e afetar o organismo fetal. Esta transferência de corpos cetônicos para o feto é reconhecidamente fator prejudicial ao desenvolvimento do SNC (BRONISZ; OZOROWSKI; HAGNER-DERENGOWSKA, 2018).

Camundongos submetidos à restrição energética materna durante a gestação e lactação apresentaram maiores dificuldade de aprendizado e memória. Evidenciando que a má nutrição materna influencia no desenvolvimento neurológico nestes animais, (FERNANDEZ-FEIJOO et al., 2017).

Somado à redução do consumo e às perdas impostas pelos vômitos, as necessidades nutricionais das gestantes se apresentam elevadas quando comparadas ao seu estado não-gravídico (INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES, 2015). Desta forma, a sintomatologia gastrointestinal, as oscilações de consumo alimentar e absorção de nutrientes maternos podem vir a prejudicar a saúde, tanto materna quanto fetal, e, por isso, devem ser investigadas (SANTANA et al., 2015).

2.2 Regulação da ingestão alimentar e obesidade

Inúmeras condições orientam o consumo alimentar. Emoções, fatores socioeconômicos, ambientais e conveniência são exemplos dos elementos que favorecem variações no consumo de energia (DRESSLER; SMITH, 2013). Entretanto, existe um ajuste biológico muito preciso que regula o consumo e o gasto energético, promovendo a homeostase energética (SCHWARTZ et al., 2000).

Hormônios e neuropeptídios são alguns dos diferentes elementos envolvidos na regulação do consumo alimentar. A integração das informações provenientes de áreas periféricas do organismo é realizada no sistema nervoso central, mais precisamente no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC) (SCHWARTZ et al., 2000). Adjacente ao terceiro ventrículo do ARC estão situadas duas linhagens de neurônios capazes de expressar neuropeptídios com efeitos anorexígenos, responsáveis pela saciedade, e orexígenos, que aumentam o apetite (SCHWARTZ et al., 2000).

Neurônios anorexígenos são responsáveis por sintetizar proopiomelanocortina (POMC), precursor do hormônio estimulante de α-melanócitos (α-MSH) e também são capazes de sintetizar o transcrito regulado pela cocaína e anfetaminas (CART). Tanto α-MSH quanto CART apresentam efeito catabólico no SNC e promovem a redução do apetite, em resposta ao aumento circulante de insulina e leptina (SCHWARTZ et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2015).

Em contrapartida, os neurônios orexígenos secretam neuropeptídio Y (NPY) e proteína relacionada ao gene agouti (AgRP), que estimulam o consumo alimentar. NPY e AgRP possuem efeito sinérgico no controle do consumo alimentar (KRASHES, 2013) e a deleção dos neurônios orexígenos pode levar à inanição(LUQUET et al., 2005; GROPP et al., 2005).

A insulina e a leptina são hormônios periféricos que atuam nos neurônios do ARC. As concentrações destes hormônios no SNC refletem suas concentrações plasmáticas, que é proporcional ao consumo de alimentos e aos depósitos de tecido adiposo (SCHWARTZ et al., 2000). O aumento na concentração de insulina e leptina no SNC inibe os neurônios orexígenos NPY e AgRP, enquanto exercem efeitos opostos em POMC, estimulando α-MSH e CART, implicando na promoção da saciedade (RAMAMOORTHY et al., 2015).Outras áreas hipotalâmicas, como o núcleo paraventricular (PVN), zona incerta e área lateral do hipotálamo (LHA), são inervadas por projeções neuronais do ARC. Nestas áreas, os neuropeptídios anorexígenos α-

MSH e CART estimulam a liberação do hormônio liberador de tireotrofina (TRH) pelo hipotálamo (SCHWARTZ et al., 2000; RODRIGUES et al., 2018).

O TRH hipotalâmico estimula a hipófise a sintetizar e secretar tireotrofina (TSH), que, por sua vez, atua na tireoide induzindo a liberação de triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), aumentando o gasto energético e a termogênese (ORTIGA-CARVALHO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2018). Desta forma, além de proporcionarem saciedade, insulina e leptina participam ativamente no aumento do gasto energético basal e na termogênese (GARCIA-SOLIS et al., 2018; RODRIGUES et al., 2018).

Por outro lado, existe contra regulação hipotalâmica à ação da insulina e leptina. Em momentos de redução na disponibilidade de nutrientes ocorre indução à expressão gênica da grelina, um hormônio liberado pelo estômago que atua no SNC via receptor secretagogo de hormônio do crescimento (GHS-R), levando ao aumento do apetite mediado por NPY e AgRP. Desta forma, a grelina é mais ativa em momentos de balanço energético negativo (PERRY; WANG, 2012; SUBRAMANIAPILLAI; MCINTYRE, 2017; CUI; LOPEZ; RAHMOUNI, 2017).

Estudos prévios realizados no nosso laboratório demonstraram a diminuição da resposta anorexígena à infusão intracerebroventricular de insulina em ratas adultas. Tais animais foram submetidos à jejum parcial com 50% do consumo dos controles em ciclos alternados de dois dias em restrição e três ou cinco dias de alimentação *ad libitum,* apontando que a alimentação intermitente pode ser capaz de comprometer o controle hipotalâmico de regulação do consumo alimentar (VILCA, 2017).

Em sistemas periféricos, por sua vez, a resistência insulínica também é um fator chave no processo de desenvolvimento de risco cardiometabólico por incitar a elevação da glicemia, desenvolvimento de perfil lipídico aterogênico e inflamação (PATEL; ABATE, 2013). Portanto, a perda da resposta hipotalâmica à ação da insulina contribui para o consumo alimentar exacerbado, propiciando a obesidade.

2.3 Ação anorexígena da insulina

A insulina é um hormônio anabólico secretado pelas células *β*- das ilhotas pancreáticas em resposta ao aumento circulante de glicose e aminoácidos após as refeições (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Após atravessar a barreira hematoencefálica, a insulina liga-se aos seus receptores específicos de membrana, localizados no ARC do hipotálamo (SCHWARTZ et al., 2000; RAMAMOORTHY et al., 2015).

O receptor de insulina é dimérico, composto por uma subunidade α- extracelular, onde se dá a ligação do hormônio, e uma subunidade β- transmembrane, que transduz o sinal para o citoplasma celular (VELLOSO, 2006). Por possuir atividade intrínseca de tirosina quinase, quando a insulina se liga ao seu receptor, promove modificação conformacional, com ativação do sítio catalítico, gerando sua autofosforilação em resíduos de tirosina (VELLOSO, 2006).

Os resíduos de tirosina do receptor se ligam aos substratos do receptor de insulina (IRS), promovendo a sua fosforilação e criando sítios de reconhecimento para a proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K). Uma vez ativada, a PI3K medeia a fosforilação do fosfatidilinositol 4,5 difosfato (PIP2) em fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato (PIP3), na presença de adenosina trifosfato (ATP) (MORTON et al., 2006). Neste ponto da via ocorre *crosstalk* entre insulina e leptina, de forma que a insulina tem sua ação potencializada pela presença da leptina (VELLOSO, 2006).

O PIP3 promove a ativação de uma cascata de enzinas, dentre elas a proteína quinase B (PKB/Akt) (NISWENDER et al., 2003; MORTON et al., 2006). A sinalização da Akt no hipotálamo está envolvida na regulação do consumo alimentar e na homeostase energética. Interrupções nesta cascata de sinalização associam-se com hiperfagia, obesidade e resistência à insulina em roedores (KIM et al., 2006).

Por outro lado, os fatores de transcrição da família *forkhead box O* (FoxO) são alvos da proteína Akt/PKB, formando o eixo Akt-FoxO (ZHANG et al., 2011). No hipotálamo, destaca-se a presença do FoxO 1, que permanece na sua forma ativa dentro do núcleo celular. Porém, uma vez fosforilado, em decorrência da ativação da Akt, o FoxO 1 torna-se inativo e deixa o núcleo celular em direção ao citoplasma (Figura 1). Assim, o fator de transcrição permanece inativo quando a via de sinalização da insulina está ativada (KIM et al., 2012).

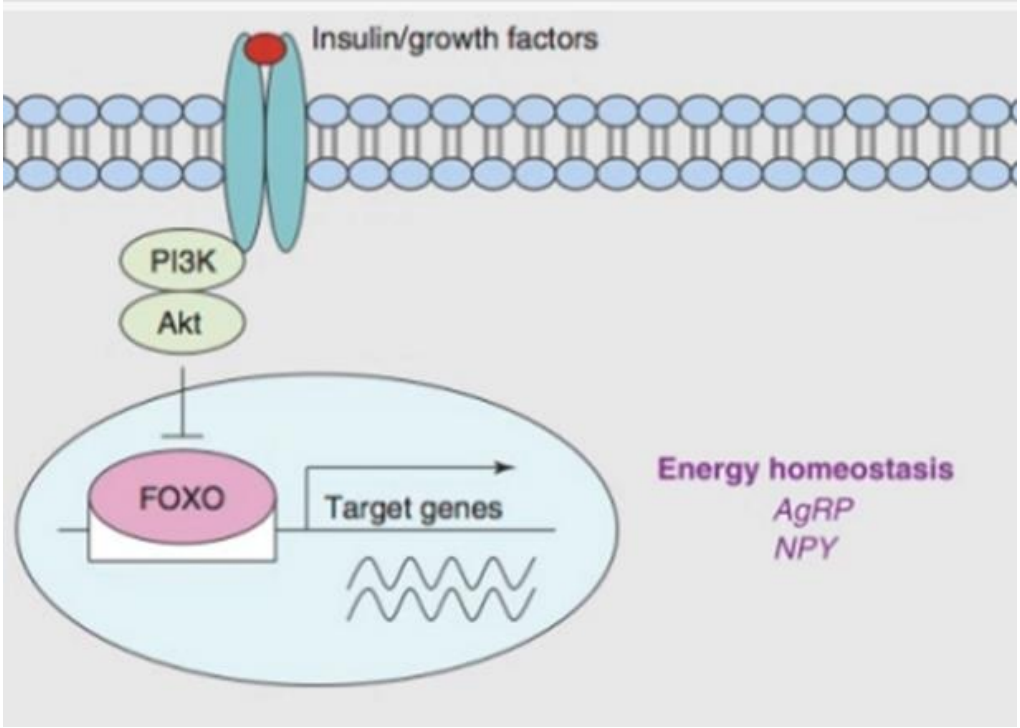

Figura 1: Circuitos hipotalâmicos e transdução dos sinais dos mecanismos envolvidos na homeostase energética. Ao se ligar em seu receptor a insulina ativa a via fosfatidilinositol 3 quinase (PI3K) que possibilita a fosforilação da proteína Akt. Uma vez fosforilada, a Akt inibe o fator de transcrição *forkhead box protein* 1 (FoxO 1), responsável pela transcrição gênica de neuropeptídios orexígenos. Adaptado de KOVALENCO (2013).

Em situação oposta, a baixa concentração de insulina no hipotálamo, e consequente inativação da proteína Akt, o FoxO 1 permanece no núcleo celular onde atua promovendo a transcrição de neuropeptídios que regulam o apetite (KIM et al., 2012). Sugere-se que no SNC o FoxO 1 aumenta a transcrição do RNAm de NPY e

AgRP. Desta forma, em momentos de hipoinsulinemia o FoxO 1 medeia, no hipotálamo, o aumento do apetite (KIM et al., 2006; ROPELLE et al., 2009).

Como citado acima, o FoxO 1 favorece comportamento orexígeno por transcrever o RNAm de NPY e AgRP e, em contrapartida, inibe a expressão de POMC, reduzindo o estímulo à saciedade. Estes eventos contribuem para o aumento do apetite durante o jejum (KIM et al., 2012). Durante o aumento da insulinemia pós-prandial, o FoxO 1 é inativado (GROSS; WAN; BIRNBAUM, 2009) e estimula a saciedade. Desta maneira, é conferido ao FoxO 1 o papel mediador da ação central da insulina no controle do apetite no SNC (ROPELLE et al., 2009).

Em tecidos periféricos, a ativação do FoxO 1 implica na regulação da transcrição de intermediários do metabolismo energético, enquanto no fígado viabiliza a expressão de enzimas gliconeogênicas, e no músculo esquelético promove a oxidação de carboidratos em detrimento dos lipídios (GROSS; WAN; BIRNBAUM, 2009).

A literatura aponta que em animais com supressão do receptor de insulina em neurônios do ARC ocorrem alterações no metabolismo. À citar, hiperfagia, aumento de deposição de tecido adiposo, desenvolvimento de obesidade induzida pela dieta, comprometimento da homeostase da glicose e aumento de citocinas pró inflamatórias no fígado (LEE et al., 2016).

2.4 Programação metabólica

Os primeiros indícios da programação metabólica surgiram a partir de correlações entre o baixo peso ao nascer e o aumento na taxa de mortalidade por doença coronariana na população de Hertfordshire na Inglaterra (BARKER; OSMOND, 1986).

Sucederam-se, então, uma série de estudos epidemiológicos correlacionando doenças crônicas na vida adulta com agravos no ambiente intraútero ou no início da vida extrauterina. Conduzido ao acaso, “O Inverno da Fome Holandesa” é considerado um dos mais importantes trabalhos epidemiológicos acerca da privação nutricional da gestante e suas implicações na saúde dos descendentes (SCHULZ, 2010). Em virtude do racionamento alimentar praticado na Holanda durante a segunda guerra mundial, entre os meses de outubro de 1944 a maio de 1945, inúmeras mulheres grávidas foram expostas à desnutrição (SCHOLTE; VAN DEN BERG; LINDEBOOM, 2015).

Por se tratar de uma região geográfica bem delimitada e ter acometido uma população com condições nutricionais adequadas, salvo no período supracitado, foi possível correlacionar os agravos à saúde infringidos àqueles que foram expostos às condições desfavoráveis de desenvolvimento intrauterino (SCHOLTE; VAN DEN BERG; LINDEBOOM, 2015). Os dados de saúde desta população foram coletados em três diferentes ocasiões, 1995 a 1997, 2002 a 2004 e entre 2008 e 2009 (DE ROOIJ, 2013). Foram encontradas maiores prevalências de perfil lipídico aterogênico (LUMEY et al., 2009), diabetes mellitus tipo 2 (DE ROOIJ et al., 2006; HALES; BARKER, 2013), hipertensão arterial sistêmica (CARROLL et al., 2012) e doença cardiovascular nestes indivíduos (PORTRAIT; TEEUWISZEN; DEEG, 2011).

A programação metabólica, primordialmente, considera que, o desenvolvimento fetal em ambiente desfavorável, em virtude da má nutrição materna seguida de abundância alimentar na vida extrauterina, seria capaz de modular o organismo para o favorecendo o surgimento de doenças crônicas na vida adulta (BARKER et. al., 1993). Sabe-se hoje que excessos alimentares, tabagismo, exposição à agentes químicos durante a gestação, são alguns dos fatores promotores de prejuízos metabólicos no feto. Desta forma, o conceito de programação metabólica se expandiu e atualmente integra a chamada origem do desenvolvimento da saúde e da doença (DOHaD) (HANSON; GLUCKMAN, 2014).

Devido às implicações éticas relativas aos estudos da programação metabólica em humanos, os modelos experimentais são de grande valia. Eles permitem esclarecimentos a respeito das etapas críticas do desenvolvimento, das diferentes adversidades às quais a prole é submetida assim como a intensidade e duração da agressão e suas consequências no metabolismo (CHAVATTE-PALMER; TARRADE; ROUSSEAU-RALLIARD, 2016).

Os modelos de restrição alimentar materna mais aplicados em animais utilizam dietas isocalóricas com restrição proteica ou, restrição energética da ordem de 20 a 70% durante a gestação. O período desta restrição alimentar varia entre início da gestação, final ou, ainda, durante todo o período gestacional (BRETON, 2013).

Para que se programe em ambiente intrauterino, algum órgão ou sua função, o estímulo deve ocorrer durante o período no qual a estrutura em questão ainda é plástica e permite modificações (REMMERS; DELEMARRE-VAN DE WAAL, 2011). O chamado período crítico de desenvolvimento (BARKER, 1997; KWON; KIM, 2017).

A neurogênese hipotalâmica em ratos é iniciada pela proliferação neuroepitelial do terceiro ventrículo (BOURET, 2009). Os neurônios do ARC são gerados, em sua maior parte, entre o décimo segundo e décimo sexto dia de gestação (DEARDEN; OZANNE, 2015), enquanto que os PVN são originados no décimo segundo dia (BOURET, 2010). Embora a proliferação celular do hipotálamo ocorra por volta da metade da gestação (BOURET, 2009), as projeções de axônios destes neurônios ocorrem no período pós natal em ratos, entre o oitavo e décimo dia de vida extra uterina dos animais (DEARDEN; OZANNE, 2015), consolidando-se apenas na terceira semana pós-parto (RALEVSKI; HORVATH, 2015).

Tendo em vista a imaturidade neurológica com a qual nascem os ratos, prejuízos nutricionais, mesmo no período de lactação, são passíveis de programar metabolicamente a prole (RAMAMOORTHY et al., 2015). Independente das diferenças na gravidade e tempo de insulto nutricional os resultados da desnutrição materna nos descendentes são consistentes. A hiperfagia é comumente relacionada à causa do ganho de massa corporal na prole, isto porque rupturas na homeostase durante o período fetal implicam na alteração permanente da regulação hipotalâmica da saciedade (DEARDEN; OZANNE, 2015).

Ratas grávidas submetidas à restrição proteica geraram proles com déficit de crescimento e que apresentaram rápida retomada do crescimento (*catch-up growth)* no período pós-natal. Foi sugerido que esta aceleração favoreceu a alterações

observadas no sistema serotonérgico hipotalâmico da prole, tornando-a vulnerável à obesidade (MARTIN-GRONERT et al., 2016).

Desta forma, os insultos nutricionais em ambos os períodos, gestação e lactação, são capazes de repercutir de forma negativa no desenvolvimento do SNC dos roedores, implicando em alterações definitivas nos sinais de fome e saciedade e contribuindo para falhas na manutenção do equilíbrio energético e aumento da incidência de obesidade (ROSS; DESAI, 2014; DEARDEN; OZANNE, 2015; RAMAMOORTHY et al., 2015).

2.5 Jejum intermitente

Alterações no estilo de vida, como a prática de atividade física e restrição energética, são os pilares para o tratamento da obesidade (DONNELLY et al., 2009; TURK et al., 2009). Dentre as práticas de restrição energética, a promoção da redução na ordem de 15 – 60% da necessidade básica diária é a mais comum (VARADY et al., 2007), entretanto, muitos indivíduos não aderem a este tipo de dieta por referirem dificuldade em manter-se focados no regime ao longo do dia e até mesmo frustrados por não poderem alimentar-se livremente (BARNOSKY et al., 2014)

Como alternativa à tradicional restrição energética diária tem-se o JI. Neste protocolo de emagrecimento é permitido o revezamento entre dias de livre consumo alimentar com dias de restrição energética ou jejum total (VARADY, 2011).

A prática de períodos de abstenção voluntária da alimentação remonta a antiguidade. Livros de etnologia e religião descrevem inúmeras formas de restrição (PATTERSON et al., 2015). O islamismo, por exemplo, tem como um de seus pilares a prática do jejum do amanhecer ao anoitecer durante o mês do Ramadan, o nono mês do calendário lunar (TENG et al., 2011). Evidências sugerem que a prática do Ramadan atenua o estado inflamatório, suprimindo a expressão de citocinas pró-inflamatórias, além da redução da gordura corporal (BILSEN et al., 2016; FARIS; KACIMI; AL-KURD, 2012).

A utilização do JI como estratégia de emagrecimento surge como uma adaptação ao Ramadan, com o propósito de perda de peso e possíveis melhorias no perfil metabólico. No JI o indivíduo se abstém ou reduz seu consumo alimentar periodicamente. Os modelos mais usuais são o jejum em dias alternados; restrição do consumo alimentar durante longos períodos ao longo do dia, cerca de 16 – 20h em jejum; e ainda o jejum total numa frequência semanal pré-definida, dois dentre os sete dias (TINSLEY; LA BOUNTY, 2015).

O JI em dias alternados consiste na alternância das intervenções dietéticas a cada 24 horas, de forma que o indivíduo teria acesso ao livre consumo de alimentos em um dia e, no dia subsequente, realizaria restrição (VARADY et al., 2007). Em termos práticos, recomenda-se a supressão diária do desjejum, almoço ou jantar. (TINSLEY; LA BOUNTY, 2015).

Comparações entre as repercussões da restrição energética crônica com o JI mostram que ambas as intervenções são capazes de promover perda de peso,

melhorar o perfil metabólico com aumento da sensibilidade à insulina e restabelecer bons padrões de lipídios plasmáticos, além de aumentarem a longevidade (BAUMEIER et al., 2015; LEE; LONGO, 2016).

A prática do JI vem sendo associado a melhorias metabólicas em pacientes obesos, com evidências de perda de peso, melhora do perfil lipídico, com redução do risco cardiovascular e redução da glicemia (BROWN; MOSLEY; ALDRED, 2013; BARNOSKY et al., 2014; KLEMPEL et al., 2012; VARADY et al., 2013). Contudo, Halberg e colaboradores (2005) submeteram adultos ao jejum em dias alternados por quinze dias e neste período não constataram perda de peso, nem alteração na gordura corporal.

Aksungar e colaboradores (2017) acompanharam obesos praticantes do Ramadan por dois anos, neste período praticaram o jejum religioso duas vezes e foram submetidos a restrição energética nos demais meses. Os resultados indicam redução gradativa do IMC, acompanhado de redução da glicemia, hemoglobina glicada (HbA1c), insulinemia, HOMA e TSH. O acetoacetato urinário foi maior durante o período de alimentação intermitente, o que sugere maior catabolismo lipídico nesta ocasião.

Modelos de programação metabólica em animais, mimetizando as oscilações de consumo características do Ramadan, detectaram alterações na saúde renal. Foram verificados atraso na nefrogênese além da redução do número de glomérulos renais na prole macho de ratas prenhas (MOHANY et al., 2018).

Dorighello e colaboradores (2014) pesquisaram os possíveis efeitos protetores do JI em dias alternados em camundongos C57/BL6 hipercolesterolêmicos com propensão à aterosclerose e diabetes. Porém, contrariamente à sua hipótese, constataram aumento no tamanho dos adipócitos, aumento de depósito de gordura epididimal e redução de massa magra, além de aumento no colesterol total e nas frações VLDL e LDL. Concluíram que, em animais propensos às características da síndrome metabólica, o JI precipitou o aparecimento da obesidade e diabetes, uma vez que, em animais saudáveis expostos ao mesmo protocolo, verificaram melhoras nos parâmetros estudados após JI.

A restrição alimentar, com consequente perda de peso é, frequentemente, associada à rápida recuperação do peso. Verificou-se, em ratos, que a restrição energética, seguida da realimentação, promoveu aumento no consumo alimentar e

menor termogênese com maior eficiência de armazenamento de tecido adiposo (ZHAO et al., 2013).

Retention e colaboradores (2016) verificaram aumento da ordem de 65 – 75% na expressão gênica de NPY no ARC de camundongos C57/BL6 obesos após submissão ao JI em dias alternados, indicando processo contra regulatório da perda de peso.

Chausse e colaboradores (2014) também constataram distúrbios na função hipotalâmica com aumento na expressão dos neurotransmissores orexígenos AgRP e NPY. Além disso, demonstraram redução da eficiência do uso energético, possivelmente pelas alterações nos padrões metabólicos promovidos pela disponibilidade intermitente de substratos. Estas modificações podem explicar as diferenças na massa corporal e na ingestão energética.

Apesar de alguns mulçumanos considerarem que gestantes estão dispensadas do Ramadan, é fato que esta restrição alimentar é realizada durante a gravidez e tem sido associada a males na saúde do feto em desenvolvimento (EWIJK, 2011). Embora existam divergências na literatura, já foi demonstrado menor peso ao nascer em neonatos de mães que praticaram o Ramadan no primeiro trimestre gestacional (SAVITRI et al., 2014), porém, é fundamental ressaltar que os efeitos adversos na saúde são constatados, mais frequentemente, com o envelhecer, como problemas coronarianos e diabetes mellitus tipo 2 (EWIJK, 2011).

O padrão alimentar intermitente é factível de ocorrer durante a gestação. Seja devido aos sintomas de náuseas e vômitos, por questões culturais ou mesmo para minimizar o ganho de peso gestacional. A redução do consumo energético na gestação devem ser analisadas de maneira consistente por provocar prejuízo à saúde fetal. Assim, o modelo de JI aplicado neste trabalho visa fornecer mais subsídios acerca dos danos ocasionados pela alimentação intermitente na gestação, além de maiores esclarecimentos relativos à magnitude da restrição energética e as respostas metabólicas fetais em decorrência desta prática.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar se a exposição de ratas grávidas ao JI determina programação metabólica da ação hipotalâmica da insulina na prole macho adulta.

3.2 Específicos

- Avaliar o ganho de massa corporal e a ingestão alimentar materna
- Quantificar a concentração plasmática de glicose e triacilglicerol materna;
- Quantificar os depósitos de gordura visceral materna;
- Avaliar o ganho de massa corporal e a ingestão alimentar da prole após o desmame;
- Quantificar a concentração plasmática de glicose, insulina, colesterol total e frações (HDL-c, LDL-c) e triacilglicerol da prole;
- Determinar o índice HOMA-IR da prole;
- Quantificar os depósitos de gordura visceral da prole;
- Quantificar o teor hipotalâmico da proteína Akt fosforilada (p-Akt) da prole;
- Quantificar a expressão gênica do fator de transcrição FoxO 1 no hipotálamo da prole;
- Avaliar a resposta alimentar após infusão intracerebroventricular de insulina na prole.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética e condições experimentais

O protocolo do presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ - Campus Macaé sob o protocolo nº Mac 030 (ANEXO).

Machos e fêmeas adultos, provenientes do biotério do Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) no Polo Universitário da UFRJ - Campus Macaé, foram mantidos em biotério de experimentação sob condições controladas de luz (claro:escuro de 12h), temperatura constante (24 ± 2ºC), livre acesso à agua e ração de acordo com o protocolo descrito na subseção subsequente.

4.2 Animais e desenho experimental

Aos 60 dias de vida, fêmeas *Wistar* (n=10) foram submetidas à copulação com machos da mesma linhagem, sendo 3 fêmeas para 1 macho (3F:1M) diariamente durante períodos de ciclo escuro. A cada início do ciclo claro (7h) a secreção vaginal de cada rata foi coletada para avaliação da prenhez. Após confirmação da prenhez por detecção de espermatozoides no material (1º dia da gestação), as ratas foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: Controle (C), restrito na primeira (R1) e na segunda metade da gestação (R2) e restrito integral (RI) na gestação. No período de restrição, conforme protocolo de cada grupo, as ratas receberam em dias alternados ração relativa à 60% do consumo médio das fêmeas C. Durante a gestação os animais permaneceram em gaiolas individuais.

Ambos os grupos restritos na metade da gestação foram submetidos a 5 ciclos de jejum parcial, sendo o grupo R1 no 2º, 4º, 6º, 8º e 10º dia; o grupo R2 no 12º, 14º, 16º, 18º e 20º dia da gestação; e os animais RI tiveram 10 ciclos de jejum parcial em dias alternados, do 2º ao 20º dia de gestação. Nos dias em que não foi realizado o jejum parcial a ração foi oferecida *ad libitum* a todos os grupos. A restrição foi somente alimentar e não hídrica.

No 2º dia pós-parto, foi registrado o número de filhotes, sexagem da prole, peso da ninhada e ajuste da mesma para 8 filhotes. Foi priorizado o maior número de machos, por demanda do modelo experimental.

Ao final da lactação, 30º dia de vida, os filhotes machos foram transferidos para gaiolas coletivas, onde permaneceram com livre acesso à água e ração até os 100 dias de vida. Para a realização dos experimentos foram utilizados, no máximo, dois animais de cada mãe para cada análise, a fim de minimizar viés genético das amostras. O desenho experimental pode ser visualizado na figura 2.

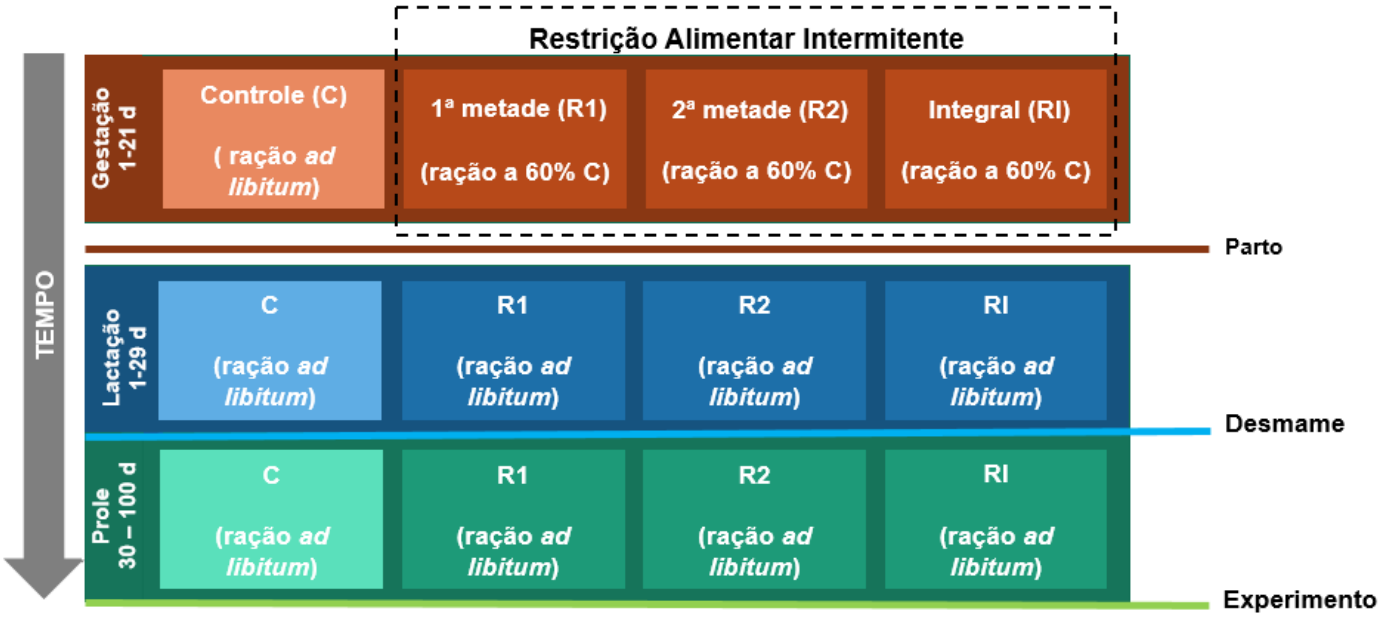

Figura 2: Desenho experimental.

4.3 Avaliação ponderal e do consumo alimentar

O consumo alimentar das ratas foi monitorado diariamente pela manhã, sendo considerada a diferença entre a ração ofertada e a sobra na gaiola, após período de 24h. O consumo materno durante a lactação foi realizado até o décimo oitavo dia pós-parto. A avaliação do consumo da prole foi realizada semanalmente e medido o valor relativo a 24 h, iniciado na semana de desmame (30 dias de vida) e finalizado em 100 dias de vida.

A evolução ponderal materna foi realizada no primeiro e no último dia de gestação e lactação. A prole teve a massa corporal acompanhada semanalmente desde o nascimento até a eutanásia, considerando o mesmo dia as avaliações de massa corporal e do consumo alimentar. Todas as medidas foram realizadas utilizando-se balança digital (Toledo®) com capacidade para 3 kg e resolução de 0,001 kg.

4.4 Coleta de tecidos

Imediatamente após o período de lactação ou no 100º dia de vida as ratas e as proles, respectivamente, foram eutanasiados, com guilhotina, e realizado o procedimento de retirada dos tecidos hipotalâmico e adiposo visceral. Para a avaliação da adiposidade visceral materna foram retirados e pesados os depósitos retroperitoneal (RET), mesentérico (MES) e periovário (PO). Nas proles forma coletados os tecido RET, MES e epididimal (EPI).

4.5 Avaliações plasmáticas

Para a realização dos ensaios bioquímicos maternos e da prole os animais foram jejuados por 12 horas e, após decapitação, o sangue foi colhido em microtubos. As amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos a 4 °C. O plasma foi separado e aliquotado para análise.

Os teores plasmáticos de glicose, triacilgliceróis, colesterol total (CT) e fração *High-density lipoprotein*/ lipoproteína de alta densidade (HDL) foram determinados utilizando método colorimétrico-enzimático, por kit comercial (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil). O v*ery low density lipoprotein*/ lipoproteína de muita baixa densidade (VLDL-colesterol) e o *low density lipoprotein*/ lipoproteína de baixa densidade (LDL-colesterol) foram determinados a partir da fórmula de Friedewald, Levy, Fredrickson (1972). Os resultados foram expressos em mg/dL.

A insulina plasmática foi avaliada por ELISA (*Rat/Mouse Insulin ELISA* kit *EMD Millipore Corporation*, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Ademais, foi determinado o índice de HOMA-IR (resistência à insulina) para roedores (CACHO et al., 2008).

4.6 Quantificação hipotalâmica da proteína Akt fosforilada (p-Akt)

O hipotálamo dos animais foi retirado e rapidamente homogeneizado em 1 mL de tampão de extração de proteínas (Trizma base 100 mM, pH 7,5; Aprotinina 0,1 mg/mL; PMSF 2 mM; Ortovanato de sódio 10 mM; Fluoreto de sódio 100 mM; Pirofosfato de sódio 10 mM e EDTA 10 mM). As amostras foram adicionadas de 100 µL de Triton X-100 10%, mantidas em gelo por 30 minutos e centrifugadas a 12.000

rpm/ 20 minutos a 4 ºC. Os sobrenadantes foram coletados e mantidos em freezer a -80 ºC até a realização da eletroforese.

O homogeneizado hipotalâmico foi submetido à dosagem de proteínas totais utilizando kit de reagentes do ácido bicinconínico (BCA, *Bioagency*, São Paulo, Brasil) (LOWRY et al, 1951). A quantidade de amostra normalizada para 50 µg de proteína foi adicionada de 25 µL de tampão Laemmeli (Azul de bromofenol 0,01 %; Fosfato de sódio 50 mM; glicerol 25%; SDS 1%) contendo DTT (200 mM).

As proteínas foram separadas em gel de poliacrilamida a 10% por eletroforese. Após a separação, as proteínas contidas no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (RPN303E; *GE Healthcare*, São Paulo, Brasil), a 100 V por 90 minutos sob refrigeração. As membranas foram bloqueadas a 4ºC no período noturno em 5 mL de solução composta de solução basal (Trizma base 100 mM; EDTA 1 mM; Triton X-100 0,5%) e albumina a 1-3%.

No dia seguinte, após duas lavagens de 5 minutos com solução basal incubou-se a membrana por 2 horas à temperatura ambiente, com os anticorpos para Akt (1:1000; #2382; *Cell Signaling*, Boston, EUA), diluídos em solução de bloqueio. Após a incubação, foram realizadas 3 lavagens de 10 minutos com solução basal e a membrana foi incubada com anticorpo secundário associado a peroxidase (Anti-rabbit IgG, *HRP – Linked Antibody*; *Cell Signalling*, Boston, EUA) por 1 hora, após a qual procedeu-se 3 lavagens de 10 minutos com solução basal para revelação.

Para identificação da banda da proteína de interesse, as membranas foram expostas ao reagente quimiluminescente ECL e reveladas em fotodocumentador L-Pis Chemi Express (Loccus Biotechnology, São Paulo, Brasil) e comparadas ao peso molecular de proteína compatível no padrão. As membranas foram descarregadas dos anticorpos anteriormente ligados e incubadas com primeiro e segundo anticorpo para identificar a proteína α-tubulina (1610324-Bio-rad, São Paulo, Brasil). As bandas das proteínas de interesse foram quantificadas por densitometria, utilizando-se *software* Image J (NIH Image, Bethesda, Maryland, EUA).

4.7 Análise da expressão gênica de FoxO 1

Após a eutanásia, o hipotálamo de cada animal foi rapidamente dissecado e homogeneizado em 1 mL de Trizol (*Thermo Scientific, Invitrogen, Thermo Scientific*, Massachussetes EUA). Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a

12.000 g por 15 minutos a 4ºC. Os sobrenadantes coletados e adicionados de 200 µL de clorofórmio e centrifugados a 12.000 g por 15 minutos a 4ºC para separação de fases. Nesta etapa formaram-se 3 fases: fenólica, interfase e aquosa, sendo esta última, a fase que contém o RNA.

Extraída a fase aquosa, cada amostra foi adicionada de 500 µL de isopropanol, incubada por 10 minutos e centrifugada à 12.000 g por 10 minutos em refrigeração para precipitação de RNA, que se torna visível com a formação de *pellet* no fundo do microtubo. Uma vez precipitado, o sobrenadante foi descartado por inversão e os *pellets* foram lavados com etanol 75% (diluído com água ultrapura livre de DNAse e RNAse), evaporados em temperatura ambiente e suspensos em 20 µL de água.

A qualidade e concentração de RNA foram avaliadas com a utilização do aparelho Nanodrop (*Thermo Scientific*), considerada melhor relação nos comprimentos de onda A260/280 entre 1,90 e 2,09. As amostras de RNA foram estocadas em freezer até a síntese de cDNA.

O cDNA foi sintetizado por meio de kit comercial *High – Capacity* cDNA (*Applied Biosystems*, Massachussetes, EUA), com a adição de 10 µL de *mastermix* (2 µL de 10X RT *Buffer*, 0,8 µL de 25X *dNTP mix*, 2 µL de 10X RT *Random primers*, 1 µL de MultiScribe RT e 4,2 µL de água livre de nuclease) e 10 µL de amostras de RNAm normalizada entre 1 e 3 µL/RNA por amostra. Após o preparo das reações, a placa contendo as amostras foi colocada em termociclador com as especificações do Quadro 1.

Quadro 1 - Condições de tempo e temperatura para síntese de cDNA

	Passo 1	**Passo 2**	**Passo 3**	**Passo 4**
Temperatura	25ºC	37ºC	85ºC	4ºC
Tempo (min.)	10	120	5	∞

Uma vez obtido o cDNA, procedeu-se a quantificação da expressão gênica mediante a amplificação pela técnica de PCR em tempo real (*Real Time* PCR ou reação em cadeia de polimerase) por meio de aparelho *StepOne Plus* (*Applied Biosystems*). Foram utilizadas sondas customizadas para o gene FoxO 1 e para a

amplificação do RNA usou-se *mastermix* TaqMan (*Applied Biosystem*). Após o preparo das reações, as placas foram centrifugadas à 2.500 rpm por 5 minutos para a eliminação de bolhas de ar carregadas no aparelho com os parâmetros descritos no Quadro 2.

As análises foram realizadas em triplicata e os resultados analisados em ΔΔCT, utilizando-se gene 18S como controle endógeno.

Quadro 2 - Parâmetros para a amplificação do mRNA no *StepOne Plus*

Parâmetro	**Ativação da polimerase**	**PCR (40 ciclos)**	
		Desnaturar	**Anelar/ Estender**
Temperatura	95ºC	95ºC	60ºC
Tempo (min)	10:00	00:15	01:00

4.8 Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular (icv) de insulina

Aos 92 dias de vida os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânula ICV. O procedimento foi realizado em aparelho esterotáxico (David Kopf *Instruments*, *model* 900 *Small animals Stereotaxic Instrument,* Califórnia EUA), com os animais profundamente anestesiados com a mistura ketamina/ xilazina (2:1) (67/13 mg/kg de massa corporal intraperitoneal) e a implantação da cânula guia (21G; 1,7cm) no ventrículo cerebral lateral esquerdo obedecendo as seguintes coordenadas: anteroposterior (AP): -1,3 mm; lateral (L): +2 mm e dorsoventral (DV): -3,4 mm; a partir do bregma (PAXINOS, 2009).

Após a cirurgia, os animais receberam dose única de antibiótico (0,2g/kg de massa corporal) e permaneceram no biotério, em gaiolas individuais com livre acesso à água e ração, durante 6 dias.

No sétimo dia pós-operatório, os animais, previamente jejuados por um período de 6 horas, foram pesados e em seguida receberam infusão de 5 µL de veículo (solução salina 0,9%) ou 5 µL de insulina regular (Humana recombinante, Biobrás, Minas Gerais, Brasil), diluída em veículo, correspondendo a uma dose de 20 µU. As infusões foram realizadas sempre ao final do ciclo claro (17-18h) e, em seguida, foi oferecida quantidade conhecida de ração e o consumo avaliado após 24 horas, a partir

da infusão. Dois dias após a primeira infusão, foi repetido o procedimento, sendo a segunda infusão diferente da primeira, de maneira que todos os ratos receberam ambas as infusões (salina e insulina), sendo controles de si mesmo.

4.9 Análise estatística

Dados apresentados com média e erro padrão da média, tratados com o *software* GraphPad Prism versão 7.03 (©GraphPad Software, Inc., La Jolla, Califórina, EUA), o mesmo utilizado para a edição gráfica. Para as variáveis de comparação simples entre dois grupos foi aplicado teste t' de Student e para múltiplas comparações foi utilizada análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste *post hoc* Bonferroni. Foi adotado nível de significância $p<0,05$.

3 RESULTADOS

Os dados obtidos foram organizados em dois artigos preliminares.

5.1 IMPLICAÇÕES NUTRICIONAIS DO JEJUM INTERMITENTE EM FÊMEAS *WISTAR* PRENHAS

Julia Geminiani Andrade Baptista

Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Macaé, RJ/Brasil. labnex@gmail.com

5.1.1 RESUMO

Verificamos as implicações nutricionais ao final da lactação resultantes do jejum intermitente (JI) durante a gestação de ratas. Fêmeas *Wistar* foram acasaladas e após identificação da prenhez no esfregaço vaginal, foram mantidas em 4 grupos durante a gestação (21 dias) e lactação (30 dias). O grupo controle (C) recebeu ração *ad libitum* por todo o período gestacional. Os grupos restritos receberam 60% do consumo de C em dias alternados na primeira metade da gestação (R1), na segunda metade da gestação (R2) ou na gestação integral (RI). Durante a fase de lactação, foi permitido livre acesso à ração a todos os grupos experimentais. Foram analisadas a evolução da massa corporal, consumo alimentar, parâmetros bioquímicos e de adiposidade maternos. Na prole verificou-se número de filhotes por ninhada e massa corporal ao nascer. Os grupos R2 e RI apresentaram ganho de massa corporal na gestação menor comparado ao C e R1. As ratas restritas apresentaram episódios hiperfágicos nos dias *ad libitum*. Na lactação, o consumo de ração e a massa não diferiram entre os grupos. Ao final da lactação a adiposidade visceral das ratas restritas foi maior que o C. Dados de peso as nascer e número de filhotes da ninhada não apontam prejuízos à prole durante a gestação. O comportamento hiperfágico não se manteve na lactação. Entretanto, a maior adiposidade visceral, mesmo 30 dias após o tratamento, aponta para o risco de obesidade consequente ao JI na gestação.

Palavras chave: Jejum intermitente; Gestação; Adiposidade visceral; Lactação; Hiperfagia.

5.1.2 INTRODUÇÃO

Durante o período gestacional, o metabolismo materno enfrenta importantes adaptações. O corpo feminino experimenta alterações fisiológicas e homeostáticas para atender às necessidades fisiológicas do feto, para manter a própria saúde materna e ainda para o estabelecimento da produção de leite (MEO; HASSAIN, 2016).

A fase inicial da gestação é considerada anabólica, com aumento da sensibilidade à insulina materna e dos depósitos de gordura, promovendo o estabelecimento de reservas que virão a ser utilizadas em momentos mais tardios da gestação (LAIN; CATALANO, 2007). Estes períodos são, por sua vez, caracterizados por maior catabolismo materno, com redução da sensibilidade a insulina e consequente maior disponibilização de glicose e ácidos graxos para o metabolismo fetal. Perturbações na fisiologia materna no curso da gestação podem comprometer a saúde materno – fetal (LAIN; CATALANO, 2007;.MEO; HASSAIN, 2016). Mesmo com a redução global da mortalidade materna (WHO, 2014), a nutrição da gestante ainda preocupa (CHRISTIAN et al., 2015), pois, além de questões socioeconômicas, inúmeros fatores podem promover prejuízo à nutrição materna antes ou mesmo durante o período gestacional (BAIÃO; DESLANDES, 2008).

Sintomas gastrointestinais, como náuseas e vômitos constituem exemplo de privação nutricional involuntária que ocorre, principalmente, no período inicial da gestação, acometendo cerca de 35 a 91% (EINARSON; PIWKO; KOREN, 2013) e a hiperêmese gravídica 1,5% das gestações (FIASCHI; NELSON-PIERCY; TATA, 2016). Em contrapartida, o Ramadan pode ser considerado como restrição alimentar voluntária. Esta prática é um exemplo no qual mulheres mulçumanas permanecem por até 30 dias do período gestacional em jejum total (EWIJK, 2011) no horário diurno. Estima-se que 50 a 70% das gestantes iranianas aderem, ao menos por um dia, ao Ramadan. Enquanto que na Inglaterra, Singapura, Estados Unidos, Gambia e Iêmen, 70 à 90% das gestantes se abstêm, voluntariamente, do consumo alimentar e de fluidos da alvorada até o anoitecer neste período (SAVITRI et al., 2014).

Face o caráter invasivo do jejum intermitente (JI) na gestação, os modelos animais são utilizados para explorar os riscos fisiológicos aos os organismos, sob restrição alimentar na gestação estão sujeitos. Porém, a maior parte dos estudos promove restrições, energética ou proteica, de maneira crônica na gestação ou na lactação (CHAVATTE-PALMER; TARRADE; ROUSSEAU-RALLIARD, 2016;

BRETON, 2013). Desta forma, evidências sobre o JI na gravidez e suas consequências na saúde materna são escassas.

Protocolos de JI são difundidos para fins de emagrecimento e melhora de perfil metabólico em humanos (BROWN; MOSLEY; ALDRED, 2013). Concomitantemente, avalia-se em animais possíveis benefícios e prejuízos biológicos associados à esta prática alimentar (DORIGHELLO et al., 2014; DULLOO; SEYDOUX; GIRARDIER, 1995).

Dentre as diferentes formas de JI, está a restrição alimentar em dias alternados, nos quais o indivíduo tem livre acesso à alimentação em um dia, seguido de um dia de privação que pode alcançar até 90% do consumo habitual em humanos. Este ciclo de alternância se repete sucessivamente até o resultado almejado em relação à perda de peso ou melhora do perfil metabólico (KLEMPEL et al., 2012).

O JI é passível de ser praticado na gestação, seja por causas fisiológicas como a imposição em decorrência dos sintomas gastrointestinais que interfere no consumo e absorção de nutrientes (CROZIER et al., 2016, SANTANA et al., 2015), ou mesmo intencional por conta de regimes religiosos (EWIJK, 2011; SAVITRI et al., 2014) ou de modismos.

Numa tentativa de minimizar a exposição do organismo à restrição alimentar em resposta aos sintomas de náuseas e vômitos, avaliamos em ratas, o resultado da submissão ao jejum intermitente em dias alternados nos parâmetros nutricionais e bioquímicos.

5.1.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.3.1 Animais e desenho experimental

Fêmeas *Wistar* (n=10) foram mantidas em biotério sob condições controladas de luz (12h claro/ 12h escuro) e temperatura (24 ± 2ºC). Aos 60 dias de vida, as ratas foram submetidas ao acasalamento e, após identificação da prenhez por meio da presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos: controle (C), restrito na primeira (R1) e na segunda (R2) metade da gestação, e restrito na gestação integral (RI). Os grupos foram restritos em 60% do consumo médio dos animais C. Durante a gestação, os animais permaneceram em gaiolas individuais e com livre acesso à água.

Ambos os grupos (R1 e R2) foram submetidos a 5 dias de restrição no respectivo período do protocolo de tratamento, enquanto o grupo RI foi exposto a 10 dias de jejum parcial em dias alternados, do 2º até o 20º dia de gestação. Nos dias não restritos a ração foi oferecida *ad libitum* a todos os grupos. Para o período da lactação, no 2º dia pós-parto, a prole foi ajustada para 8 filhotes por rata em todos os grupos. As mães foram mantidas até o final da lactação, quando ocorreu a o experimento e a coleta de tecidos.

Todo o protocolo experimental foi submetido e aprovado pela Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA do Campus Macaé da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

5.1.3.2 Massa corporal e consumo alimentar

A avaliação da massa corporal durante a gestação foi realizada pela diferença entre a massa corporal no primeiro e último dia de prenhez. O consumo alimentar na gestação foi monitorado, diariamente, no turno da manhã, sendo considerada a diferença entre a ração ofertada e aquela consumida pelas mães num período de 24h.

Durante a lactação, o consumo alimentar materno de 24 horas e a avaliação da massa corporal foram realizados a cada 4 dias, a partir do 2º dia pós-parto ao 18º dia da lactação.

5.1.3.3 Gordura visceral e avaliações plasmáticas

Após eutanásia, os depósitos periovário (PO), mesentérico (MES) e retroperitoneal (RET) foram identificados, removidos e pesados.

A concentração de glicose e triacilglicerol foram realizadas por método enzimático usando kit comercial (Glucose Liquicolor, Fastlab Diagnóstica, Triglicérides Liquicolor, Fastlab Diagnóstica, Rio de Janeiro, Brasil).

5.1.3.5 Análise dos dados

Os dados estão apresentados como média e erro padrão da média e tratados pelo pacote estatístico GraphPad Prism versão 7.03 (©GraphPad Software, Inc., Califórina, EUA). Para as variáveis de múltiplas comparações, foi aplicada ANOVA de uma via, seguida do teste *post hoc* Bonferroni, considerando nível de significância $p<0,05$.

5.1.4 RESULTADOS

5.1.4.1 Evolução da massa corporal materna, adiposidade e características da prole ao nascimento.

A massa corporal das ratas no início e final da gestação não diferiu entre os grupos. Foram observados aumentos de 50%, 63%, 42% e 46% nos grupos C, R1, R2 e RI, respectivamente, demonstrando que o tratamento não promoveu comprometimento do estado nutricional das ratas (Figura 1).

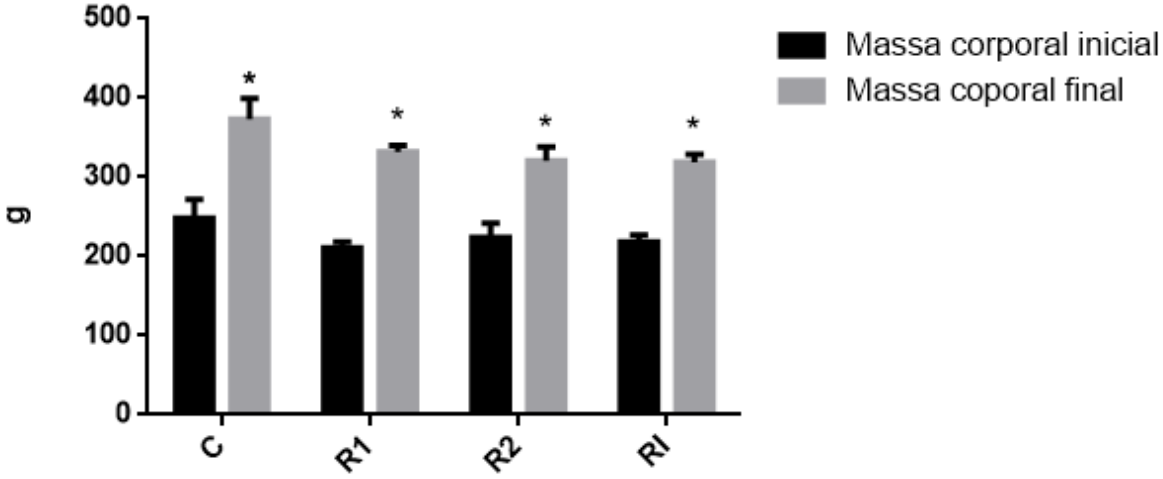

Figura 1: Massa corporal inicial e final na gestação dos grupos Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM e significância para p<0,05. * versus massa corporal inicial. n = 6 por grupo.

Porém, ao analisar o ganho de massa corporal na gestação, as fêmeas R2 e RI apresentaram menor ganho quando comparadas à C e R1 (tabela 1). Não foram observadas diferenças entre os grupos quanto à massa inicial e ao final do período de lactação (tabela 1).

No que se refere ao tecido adiposo, porém, foi constatado aumento no teor de gordura visceral total em todos os grupos restritos vs. C, na ordem de 825% (R1), 119% (R2) e 108% (RI) (tabela 1). Não foram observados diferença nos depósitos isolados (MÊS, RET, PO) entre os grupos (tabela 1).

Não foram observadas diferenças nas concentrações plasmáticas de glicose e triglicerídios entre os grupos (tabela 1). Nos dados avaliados, número de filhotes por

ninhada e massa corporal da ninhada não constataram-se discrepâncias (tabela 1). Do mesmo modo, o tempo de duração das gestações e a prevalência de sexo masculino/ feminino não diferiu entre os grupos.

Tabela 1: Dados maternos e características da prole ao nascer.

	C	R1	R2	RI
Massa corporal gestação inicial (g)	248,20 ± 23,82	211,00 ± 7,68	224,00 ± 18,29	218,43 ± 8,64
Massa corporal gestação final (g)	373,40 ± 25,98	331,83 ± 8,46	320,50 ± 17,80	318,86 ± 10,11
GMG (g)	132,00 ± 6,89	127,20 ± 8,44	96,50 ± 1,19* #	100,43 ± 2,95*#
Massa corporal lactação inicial (g)	256,25 ± 13,25	225,80 ± 9,89	263,80 ± 15,97	237,00 ± 13,60
Massa corporal lactação final (g)	280,25 ± 21,99	250,20 ± 6,27	276,00 ± 11,79	261,50 ± 12,86
Mesentérico (g)	0,55 ± 0,15	0,93 ± 0,36	0,99 ± 0,33	1,00 ± 0,39
Retroperitoneal (g)	0,37 ± 0,23	0,49 ± 0,07	0,72 ± 0,35	0,53 ± 0,27
Periovariano (g)	0,51 ± 0,37	0,82 ± 0,27	0,98 ± 0,60	0,98 ± 0,40
Adiposidade total (g)	1,22 ± 0,11	2,24 ± 0,10*	2,69 ± 0,34*	2,56 ± 0,41*
Glicose (mg/dL)	120,8 ± 7,18	107,4 ± 12,73	110,9 ± 24,36	110,5 ± 27,28
Trigliceridemia	170,1 ± 14,19	151,3 ± 16,03	163,6 ± 16,57	124,2 ± 19,17
Nº filhotes	11,75 ± 1,03	11,80 ± 1,32	12,80 ± 0,66	11,00 ± 1,68
Massa corporal ninhada (g)	78,00 ± 4,04	75,40 ± 4,28	71,00 ± 4,28	67,00 ± 5,26

Tabela1: Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM. GMG: ganho de massa corporal na gestação. $p<0,05$: * vs. C, # vs R1. n = 6 por grupo.

5.1.4.2 Consumo de ração materno na gestação e lactação

Enquanto o consumo de ração foi semelhante entre C e R1, as ratas R2 apresentaram menor consumo de ração ao final do período gestacional comparado às ratas C. De forma similar, as ratas RI apresentaram ingestão menor vs. C e R1 (Figura 2). Na lactação, o consumo alimentar não diferiu entre os grupos.

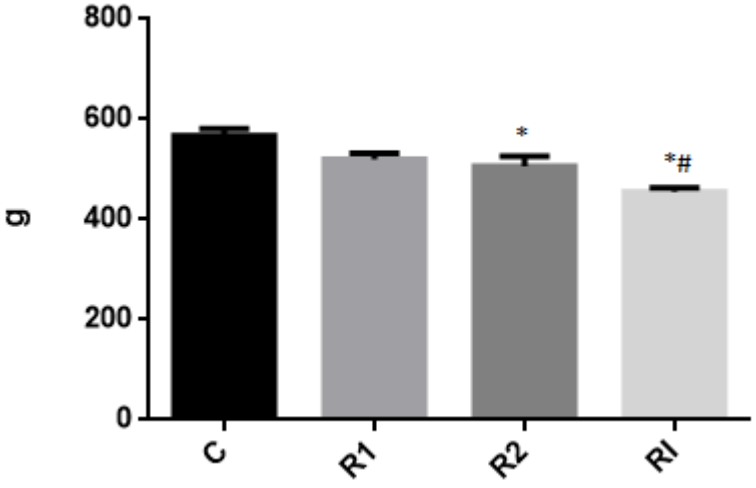

Figura 2: Ingestão de ração acumulada na gestação dos grupos Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM e significância para p<0,05. * versus C, # versus R1. n = 6 por grupo.

A análise do consumo alimentar nos dias de livre acesso à ração demonstrou que todos os grupos restritos mantiveram consumo acima do grupo C, embora tenha sido observado hiperfagia nas gestantes R1 (Figura 3A) em 3 dos 5 dias de jejum, nas ratas R2 (Figura 3B) ocorreu em 1 dos 5 dias de jejum e nas RI (Figura 3C) em somente 3 dos 10 dias de JI.

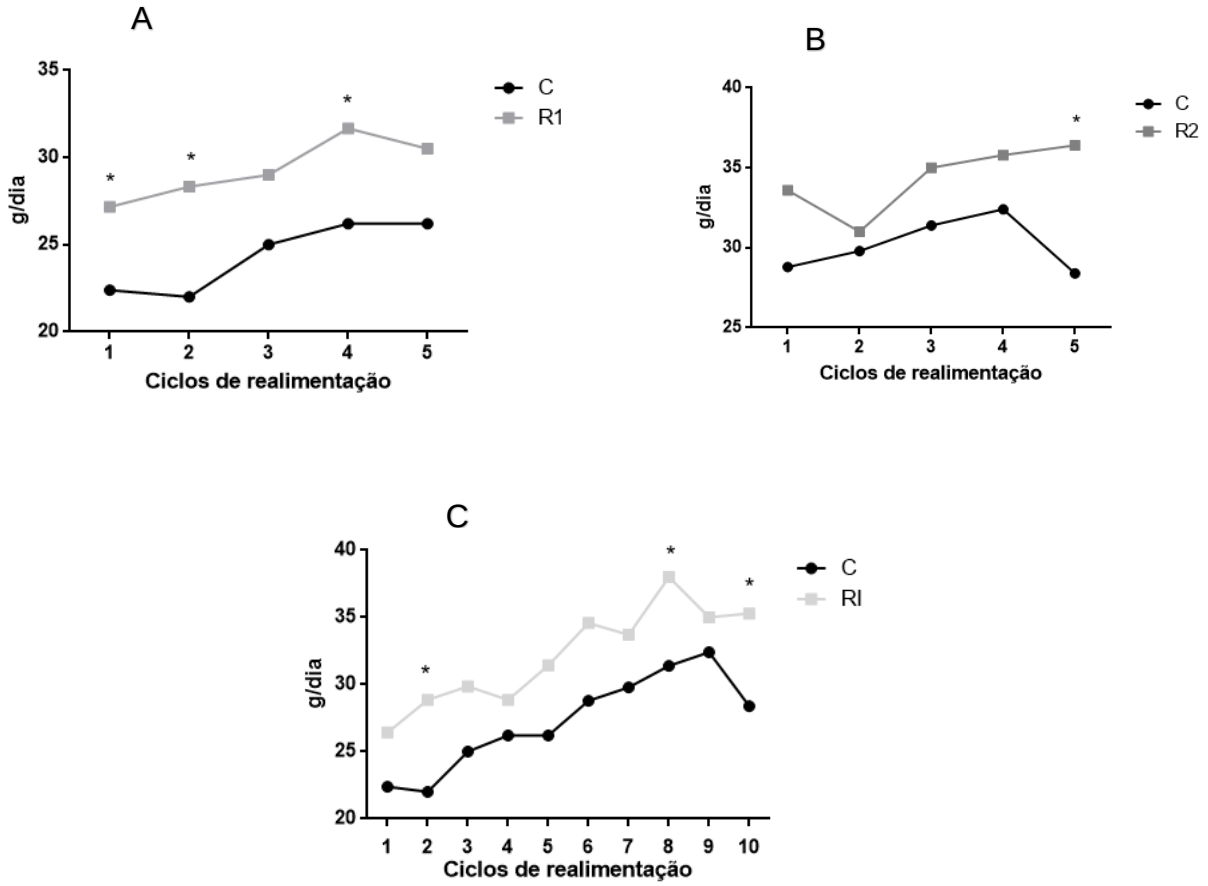

Figura 3: Consumo alimentar no período pós jejum intermitente dos grupos Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM e significância para p<0,05. * versus C. n = 6 por grupo.

5.1.5 DISCUSSÃO

Ao submeter ratas prenhas ao JI em dias alternados na gestação averiguamos alterações no consumo alimentar e maior deposição de gordura nos animais restritos, indicando possibilidade de alterações metabólicas que induzem à obesidade. Não foram evidenciados danos ao nascimento na prole.

Observamos que o JI na gestação de ratas promoveu elevado consumo de ração em todos os dias de livre acesso à mesma, sinalizando o estabelecimento de comportamento hiperfágico em todos os grupos restritos. Recentemente foi demonstrado, em modelo de JI em ratas não grávidas e com restrição a 50% do C, comportamento hiperfágico nos dias de alimentação *ad libitum* (FERNÁNDEZ et al., 2018). Chausse e colaboradores (2014) evidenciaram que camundongos machos (C57BL/6) submetidos ao JI a 100% do controle em dias alternados ao longo de três semanas, além de comportamento hiperfágico, apresentaram aumento da expressão hipotalâmica dos neurotransmissores orexígenos AgRP e NPY. Sugerindo este fato como possível determinante para a hiperfagia nestes animais. Tais resultados se assemelham ao do presente estudo, com a observância de que o jejum foi realizado em ratas grávidas e nenhum resultado com este modelo foi encontrado.

Evidenciamos que as ratas gestantes foram capazes de ganhar massa corporal mesmo quando submetidas ao JI em dias alternados, mas demonstramos que se a restrição envolve a segunda metade da gestação pode determinar maior prejuízo. Possivelmente, em virtude da maior demanda nutricional dos períodos finais da gestação (RINAUDO; WANG, 2014), as ratas submetidas a JI na segunda metade (R2) e durante toda a gestação (RI) apresentaram menor ganho de massa corporal em relação as não restritas (C).

A semelhança no ganho de massa corporal durante a gestação, exibida pelas ratas C e R1, pode estar relacionada à maior frequência de hiperfagia de R1, levando à compensação da massa corporal ao final do período de tratamento. Inesperadamente, enquanto R1 apresentou 3 episódios de hiperfagia no período, RI apresentou apenas uma ocorrência. Porém, ao final da primeira metade, o consumo acumulado de ração de R1 foi semelhante.

Possivelmente, o consumo alimentar ligeiramente elevado nos dias *ad libitum* durante o período de restrição sustentou a demanda energética das ratas. Além disso, na gestação e em organismos submetidos à privação, ocorrem alterações fisiológicas que maximizam a absorção intestinal de nutrientes (ZHANG et al., 2012).

A maior deposição de tecido adiposo visceral em fêmeas submetidas ao JI na gestação com livre acesso à ração na lactação, indica modulação metabólica prejudicial ocasionada pelo JI, visto que a deposição de gordura visceral é um dos principais determinantes do risco metabólico (PATEL; ABATE, 2013). Dorighello e colaboradores (2014) submeteram camundongos machos, previamente induzidos ao diabetes e à obesidade, ao JI em dias alternados por três meses. Contrariando as expectativas, foram verificados aumento de adiposidade epididimal, aumento na gordura da carcaça, elevação de glicemia e insulinemia, caracterizando perfil metabólico indesejável dos animais.

Embora Karbowska e Kochan (2012) tenham verificado redução da glicemia e trigliceridemia em machos *wistar* submetidos ao JI por quarenta e oito dias, sendo 3 dias de livre acesso à ração e 3 dias restritos, encontraram maior transcrição de gene envolvido na deposição de tecido adiposo. Evidenciando que há possível risco de modificação metabólica induzida pelo JI. Zhao e colaboradores (2013) sugerem que em situação de restrição alimentar o organismo se adapta para promover armazenamento mais eficiente de energia.

Não foram verificadas alterações bioquímicas nas fêmeas submetidas ao JI. Todavia, a coleta de sangue foi realizada após os trinta dias de lactação com consumo alimentar em livre demanda, fato que pode ter contribuído para que não houvesse diferença nestes parâmetros. Contudo, os resultados de estudos com JI ainda são controversos.

Enquanto Belkacemi e colaboradores (2012) verificaram melhora na tolerância à glicose e menor apoptose das células β-pancreáticas em ratos com diabetes induzido por estreptozotocina, Park e colaboradores (2017) encontraram menor tolerância à insulina e maior armazenamento de glicogênio hepático em ratos com excesso de massa corporal induzido pela dieta ao serem submetidos ao JI. Entretanto, estes não são estudos com gestante, visto que não foram encontrados protocolos experimentais com aplicação de jejum intermitente durante a gestação

Demonstramos que, diferente da restrição alimentar contínua, o JI durante a gestação não interferiu no número de filhotes e massa da ninhada. Possivelmente devido a alternância entre dias de livre acesso à ração e jejum parcial (GOTARDO et al., 2017; CHAVATTE-PALMER; TARRADE; ROUSSEAU-RALLIARD, 2016).

Desta forma, verificamos que JI a 60% da ingestão normal em ratas gestantes foi capaz de promover maior adiposidade visceral, mesmo 30 dias após o período de

restrição, e estimular maior consumo alimentar mediante acesso ao alimento. Tomados juntos, esses dados sugerem maior risco para desenvolver obesidade no período pós lactação, sem determinar, *a priori*, desfecho negativo na prole.

5.1.6 REFERÊNCIAS

BAIÃO, M. R.; DESLANDES, S. F. Pregnancy and eating behavior in pregnant women from a low-income neighborhood in Rio de Janeiro, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 11, p. 2633–2642, 2008.

BELKACEMI, L. et al. Intermittent fasting modulation of the diabetic syndrome in streptozotocin-injected rats. **International Journal of Endocrinology**, v. 96, p. 962012, 2012.

BRETON, C. The hypothalamus – adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. **The Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. 19–31, 2013.

BROWN, J. E.; MOSLEY, M.; ALDRED, S. Intermittent fasting: a dietary intervention for prevention of diabetes and cardiovascular disease? **The British Journal of Diabetes & Vascular Disease**, v. 13, n. 2, p. 68–72, 2013.

CHAUSSE, B. et al. Intermittent fasting induces hypothalamic modifications resulting in low feeding efficiency, low body mass and overeating. **Endocrinology**, v. 155, n. 7, p. 2456–2466, 2014.

CHAVATTE-PALMER, P.; TARRADE, A.; ROUSSEAU-RALLIARD, D. Diet before and during pregnancy and offspring health: The importance of animal models and what can be learned from them. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 6, p. 1–14, 2016.

CHRISTIAN, P. et al. Nutrition and maternal, neonatal, and child health. **Seminars in Perinatology**, v. 39, n. 5, p. 361–372, ago. 2015.

CROZIER, S. R. et al. Nausea and vomiting in early pregnancy: Effects on food intake and diet quality. **Maternal & Child Nutrition**, v. 13, n. 4, p. 1–10, 2016.

DORIGHELLO, G. G. et al. Food restriction by intermittent fasting induces diabetes and obesity and aggravates spontaneous atherosclerosis development in hypercholesterolaemic mice. **British Journal of Nutrition**, v. 111, n. 6, p. 979–986, 2014.

DULLOO, A. G.; SEYDOUX, J.; GIRARDIER, L. Dissociation of enhanced efficiency of fat deposition during weight recovery from sympathetic control of thermogenesis. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 269, n. 2, p. 365–369, 1995.

EINARSON, T. R.; PIWKO, C.; KOREN, G. Quantifying the global rates of nausea and vomiting of pregnancy: a meta analysis. **Journal de la Therapeutique des**

Populations et de la Pharamcologie Clinique, v. 20, n. 2, p. 171–183, 2013.

EWIJK, R. VAN. Long-term health effects on the next generation of Ramadan fasting during pregnancy. **Journal of Health Economics**, v. 30, n. 6, p. 1246–1260, 2011.

FERNÁNDEZ, M. A. R. et al. Intermittent food restriction in female rats induces SREBP high expression in hypothalamus and immediately postfasting hyperphagia. **Nutrition**, v. 48, p. 122–126, 2018.

FIASCHI, L.; NELSON-PIERCY, C.; TATA, L. J. Hospital admission for hyperemesis gravidarum: a nationwide study of occurrence, reoccurrence and risk factors among 8.2 million pregnancies. **Human Reproduction**, v. 31, n. 8, p. 1675–1684, ago. 2016.

GOTARDO, A. T. et al. Maternal feed restriction during pregnancy in Wistar rats: Evaluation of offspring using classical and immunoteratology protocols. **Human and Experimental Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 603–615, 2017.

KARBOWSKA, J.; KOCHAN, Z. Intermittent fasting up-regulates Fsp27/Cidec gene expression in white adipose tissue. **Nutrition**, v. 28, n. 3, p. 294–299, 2012.

KLEMPEL, M. C. et al. Intermittent fasting combined with calorie restriction is effective for weight loss and cardio-protection in obese women. **Nutrition Journal**, v. 11, p. 1–9, 2012.

LAIN, K. Y.; CATALANO, P. M. Metabolic changes in pregnancy. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 50, n. 4, p. 938–948, dez. 2007.

SANTANA, J. et al. Food Consumption Patterns During Pregnancy: a Longitudinal Study in a Region of the North East of Brazil. **Nutricion Hospitalaria**, v. 32, n. 1, p. 130–138, 2015.

MEO, S. A.; HASSAIN, A. Metabolic Physiology in Pregnancy. **Journal of Pakistan Medical Association**, v. 66, p. 8–10, 2016.

PARK, S. et al. Intermittent fasting reduces body fat but exacerbates hepatic insulin resistance in young rats regardless of high protein and fat diets. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 40, p. 14–22, 2017.

PATEL, P.; ABATE, N. Body fat distribution and insulin resistance. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 2019–2027, 2013.

RINAUDO, P.; WANG, E. Fetal programming and metabolic syndrome. **Annual Review of Physiology**, v. 74, n. 2, p. 107–130, 2014.

SAVITRI, A. I. et al. Ramadan fasting and newborn ’ s birth weight in pregnant Muslim women in The Netherlands. **The British Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1503–1509, 2014.

WHO. Trends in Mternal Mortality: 1990-2013. Estimates by WHO,UNICEF, UNFPA, The World Bank and the United Nations Population Division. **World Health Organisation**, p. 56, 2014.

ZHANG, L. N. et al. Physiological and behavioral responses to intermittent starvation in C57BL/6J mice. **Physiology and Behavior**, v. 105, n. 2, p. 376–387, 2012.

ZHAO, Z.-J. et al. Body mass, energy budget and leptin of mice under stochastic food restriction and refeeding]. **Zoological Research**, v. 34, n. 6, p. 574–581, 2013.

5.2 JEJUM INTERMITENTE NA GESTAÇÃO PROMOVE REDUÇÃO DA AÇÃO ANOREXÍGENA HIPOTALÂMICA DA INSULINA NA PROLE MACHO ADULTA

Julia Geminiani Andrade Baptista

Laboratório de Nutrição Experimental (LABNEX) da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Rio de Janeiro - Brasil

5.2.1 RESUMO

Avaliamos se o jejum intermitente (JI) na gestação de ratas promove alterações no consumo alimentar, parâmetros bioquímicos, massa corporais e na ação hipotalâmica da insulina na prole macho adulta. Foram definidos 4 grupos experimentais a partir de ratas acasaladas e submetidas a JI na gestação e com acesso alimentar livre na lactação. Aos 30d a prole macho foi distribuída segundo o tratamento materno nos seguintes grupos: Controle (C), proles de mães com ração *ad libitum* durante toda a gestação; prole de mães restritas na primeira metade (R1) e na segunda metade (R2) da gestação; e prole de mães restritas ao longo de toda a gestação (RI). As mães restritas tiveram alternadamente um dia de acesso a 60% do consumo alimentar do grupo C seguido de um dia de livre acesso alimentar de acordo com o período de tratamento na gestação e sem restrição hídrica. Durante a fase de lactação foi permitido livre acesso à ração a todos os grupos experimentais. A prole macho foi mantida dos 30 aos 100 dias de vida, sendo avaliado no período o consumo alimentar e a massa corporal, e após a eutanásia foram coletados sangue e os tecidos adiposo visceral e hipotalâmico. Foram constatados maior ganho de massa corporal na prole RI ao longo da lactação, enquanto na vida adulta foram observados episódios de hiperfagia, resistência periférica e central à insulina. Os resultados sugerem que o JI com restrição de 60% da alimentação na rata gestante foi capaz de determinar na prole macho adulta programação metabólica na via da insulina.

Palavras chave: Restrição alimentar intermitente; programação metabólica; Fosfo-Akt; FoxO 1; Hipotálamo; Insulinemia.

5.2.2 INTRODUÇÃO

A origem do desenvolvimento da saúde e da doença (DOHad) postula que o ambiente intrauterino ao qual o feto foi exposto contribui para a sua saúde futura (HANSON; GLUCKMAN, 2014). A má nutrição materna ou depleções de micro ou macronutrientes específicos acarretam desde ajustes fisiológicos até alterações epigenéticas que podem promover doenças crônicas na vida adulta dos seus descendentes (LEVY et al., 2017).

Em modelos animais, a restrição de nutrientes na gestação aponta modificações na estrutura e função de órgãos na prole. Dentre tais alterações, pode-se destacar a menor contagem de células *β* pancreáticas, propiciando desajustes na homeostase da insulina (PORTHA; CHAVEY; MOVASSAT, 2011).

A resistência periférica à ação da insulina, precocemente verificada nas proles metabolicamente programadas, figura como alteração primária precursora de múltiplas anormalidades metabólicas e está associada ao aumento do risco de desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica, doença cardiovascular e esteatose hepática não alcoólica. (GLASTRAS et al., 2018).

A via da insulina integra sinais nutricionais e hormonais periféricos e participa do controle da homeostase energética no hipotálamo (SCHWARTZ et al., 2000), mais especificamente, no núcleo arqueado do hipotálamo (ARC). Ao se ligar aos seus receptores, a insulina promove a ativação da via IRS-PI3K (CARVALHEIRA; ZECCHIN; SAAD, 2002). Quando ativada, esta via ocorre fosforilação da proteína Akt que, por sua vez, degrada e inativa o fator de transcrição FoxO 1 (ROPELLE et al., 2009). Por sua vez, a supressão do FoxO 1 é responsável por aumentar a transcrição dos neuropeptídios anorexígenos e pró-termogênicos (KIM et al., 2006). Concomitantemente, a insulina atua suprimindo neurônios orexígenos, propiciando, desta forma, a redução do consumo alimentar (SCHWARTZ et al., 2000).

Ralevski e Horvath (2015) sugerem que distúrbios na organização hipotalâmica fetal podem comprometer o controle da homeostase energética por redução da resposta anorexígena no sistema nervoso central (SNC). Enquanto Matos e colaboradores (2011), ao submeterem ratas à restrição calórica na gestação e lactação, verificaram que aos 90 dias de vida a prole, desnutrida no período perinatal, apresentou menor contagem de neurônios.

Todavia, são escassas as evidências sobre alterações metabólicas na prole de animais expostos a jejum parcial intermitente na gestação. A intermitência da alimentação na gestação é passível de ocorrer por diversos fatores, a exemplo por náuseas e vômitos, que podem promover menor consumo de alimentos bem como menor absorção dos nutrientes (EINARSON; PIWKO; KOREN, 2013).

Os jejuns religiosos, por sua vez, são outra demonstração de intermitência alimentar. Anualmente, por um mês, cerca de 1 bilhão de mulçumanos se privam de líquidos e alimentos da alvorada ao anoitecer durante o Ramadan (SAVITRI et al., 2014).

Desta forma, o presente trabalho objetivou, por meio do tratamento de ratas gestantes com jejum parcial intermitente, avaliar se este padrão de restrição seria capaz de promover alteração metabólica obesogênica na prole macho adulta dessas ratas, com prejuízos na ação hipotalâmica da insulina.

5.2.3 MATERIAL E MÉTODOS

5.2.3.1 Animais e desenho experimental

Fêmeas *Wistar, a*os 60 dias de vida foram acasaladas e, confirmada a prenhez, foram distribuídas aleatoriamente nos grupos que correspondem aos grupos da prole macho que seguiu no estudo. Foram 4 grupos experimentais formados da prole a partir do 2º dia pós-parto e mantidos com livre acesso à água e ração até 100º dia de vida. Ao final da lactação todas as ratas foram dirigidas a outro estudo. Grupos: Prole de mães controle (C); Prole de mães restritas na primeira (R1) e na segunda (R2) metade da gestação e; Prole de mães restrita por toda a gestação (RI). As ratas restritas receberam no dia do JI, 60% do consumo alimentar médio das C. As mães das proles R1 e R2 foram submetidos a 5 dias de jejum parcial respectivamente na 1ª e 2ª metade gestação. As mães da prole RI tiveram jejum parcial em 10 dias do 2º ao 20º dia de gestação. Todas as ratas tiveram acesso livre a alimentação nos períodos fora do JI e durante a lactação e a água foi *ad libitum* ao longo do estudo. Para a realização dos experimentos foram utilizados, no máximo, dois animais de cada mãe para cada análise, a fim de minimizar viés genético das amostras. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Uso de Animais – CEUA da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Campus Macaé – RJ.

5.2.3.2 Avaliação nutricional

As avaliações do ganho de massa corporal e do consumo alimentar da prole foram realizadas semanalmente no período entre o desmame (30 dias de vida) e a eutanásia (100 dias de vida). Para o consumo alimentar foi considerada a diferença entre a ração ofertada e o consumo de 24 horas. Para avaliação da adiposidade os depósitos epididimal (EPI), mesentérico (MES) e retroperitoneal (RET) foram removidos e pesados individualmente.

5.2.3.3 Avaliações bioquímicas

Os teores plasmáticos de glicose, triacilgliceróis, colesterol total (CT) e HDL foram determinadas utilizando método colorimétrico e enzimático, a partir de kit

comercial (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil). O VLDL-colesterol e o LDL-colesterol foram determinados a partir da fórmula de Friedewald, Levy, Fredrickson (1972). A insulina plasmática foi mensurada utilizando-se kit comercial de ELISA "*Rat/Mouse Insulin* ELISA" (EMD *Millipore Corporation*, Alemanha), conforme instruções do fabricante. Ademais, foi determinado o índice de HOMA-IR (resistência à insulina) para roedores (CACHO et al., 2008).

5.2.3.4 Western Blotting

Para a quantificação da proteína p-Akt, o hipotálamo de cada animal foi homogeneizado em 1mL de tampão de extração de proteínas (Trizma base 100 mM, pH 7,5; Aprotinina 0,1mg/mL; PMSF 2 mM; Ortovanato de sódio 10 mM; Fluoreto de sódio 100 mM; Pirofosfato de sódio 10 mM e EDTA 10 mM). As amostras foram adicionadas de 100 µL de Triton X-100 10%, e centrifugadas a 12.000rpm/ 20 minutos a 4 ºC. A dosagem de proteínas foi realizada nos sobrenadantes utilizando-se kit comercial (Bradford, Bio – Rad, Califórnia, EUA) 50 µg de proteína foram aplicadas no gel de poliacrilamida à 10%. Após a eletroforese a transferência proteica para membrana de nitrocelulose (RPN303E; GE *Healthcare*, São Paulo, Brasil) foi realizada a 100 V por 90 minutos em refrigeração. O bloqueio da reação foi realizado a 4 ºC *overnight*, em 5 mL de solução de bloqueio (Trizma base 100mM; EDTA 1mM; Triton X-100 0,5% + solução basal) e albumina a 1-3%. A Identificação da proteína foi realizada por comparação com padrão de peso molecular compatível (RPN800E – GE *Healthcare, Piscataway*, EUA).

As membranas foram incubadas por 2 horas à temperatura ambiente, com o anticorpo primário (*anti-Phospho Akt* (Ser473), *Cell Signaling*, Boston, Estados Unidos) e seguida de incubação por 1 hora com anticorpo secundário associado a peroxidase (*anti-rabbit* IgG, *Cell Signalling*, Boston, Estados Unidos). As bandas foram normalizadas utilizando a proteína alfa-tubulina como referência (*α Tubulin, Cell Signaling*, Boston, Estados Unidos). A identificação das bandas foi realizada por exposição da membrana ao reagente ECL em fotodocumentador L-Pis Chemi Express (Loccus Biotechnology, São Paulo, Brasil) e analisadas por densitometria no *software Image J* (NIH *Image, Maryland*, Estados Unidos).

5.2.3.5 PCR em tempo real

O RNA total foi extraído das amostras de hipotálamo com reagente Trizol, de acordo com instruções do fabricante (Invitrogen, *Thermo Scientific*, Massachusetes, EUA). O cDNA foi sintetizado do RNA total (2 mg) em 20 µl de reação utilizando o kit comercial High-Capacity cDNA (*Applied Biosystems*, Massachusetes, EUA) e sintetizado de acordo com a indicação do fabricante. A avaliação da concentração do gene para FoxO 1 foi realizada sistema *StepOne Plus apparatus* (*Applied Biosystems*, Massachusetes, EUA). Foram utilizados probes para os genes FoxO 1 e o 18S como gene de referência. Para a amplificação foi utilizado *mastermix* TaqMAn e utilizou-se 10µl TaqMan Universal *mastermix* (*Applied Biosystems*, Massachusetes, EUA).

5.2.3.6 Resposta alimentar à infusão intracerebroventricular (icv) de insulina

Aos 92 dias de vida os ratos foram submetidos à cirurgia estereotáxica para a implantação de cânula intracerebroventricular (ICV). O procedimento foi realizado em aparelho esterotáxico (David Kopf *Instruments*, *model* 900 *Small animals Stereotaxic Instrument,* Califórnia EUA), com os animais anestesiados com ketamina/ xilazina (2:1) (67/13 mg/kg de massa corporal intraperitoneal). O posicionamento da cânula guia (21G; 1,7cm) no ventrículo cerebral lateral esquerdo seguiu as coordenadas: Antero posterior (AP) -1,3mm; lateral (L) +2mm e dorsoventral (DV) -3,4mm; a partir do bregma (PAXINOS; WATSON, 2009). Após 7 dias de implantação da cânula, os ratos em jejum por 6 horas foram pesados e receberam através da cânula ICV infusão de 5 µL de solução salina (0,9%) ou insulina (20mU) (Humana regular recombinante, Biobrás, Minas Gerais, Brasil) diluída em salina. As infusões foram realizadas sempre ao final do ciclo claro (17-18h) e seguida de oferta de ração. O consumo foi avaliado após 24 horas da infusão. Dois dias após a primeira infusão, foi repetido o procedimento, sendo a segunda infusão diferente da primeira, de maneira que todos os ratos receberam ambas as infusões (salina e insulina), sendo controles de si mesmo.

5.2.3.7 Análise dos dados

Os dados estão apresentados com média e erro padrão da média e analisados no *software GraphPad Prism* versão 7.03 (©GraphPad Software, Inc., Califórina, EUA). Para as variáveis de comparação entre dois grupos foi aplicado teste t' de Student e para múltiplas comparações utilizou-se ANOVA seguida do teste *post hoc* Bonferroni, considerando nível de significância $p<0,05$.

5.2.4 RESULTADOS

5.2.4.1 Evolução de massa corporal da prole

No desmame (30 dias de vida), verificou-se que a prole RI apresentou massa corporal 14% maior quando comparada ao C e R1 (Figura 1), contudo aos 100 dias de vida a massa corporal média da prole não divergiu entre os grupos.

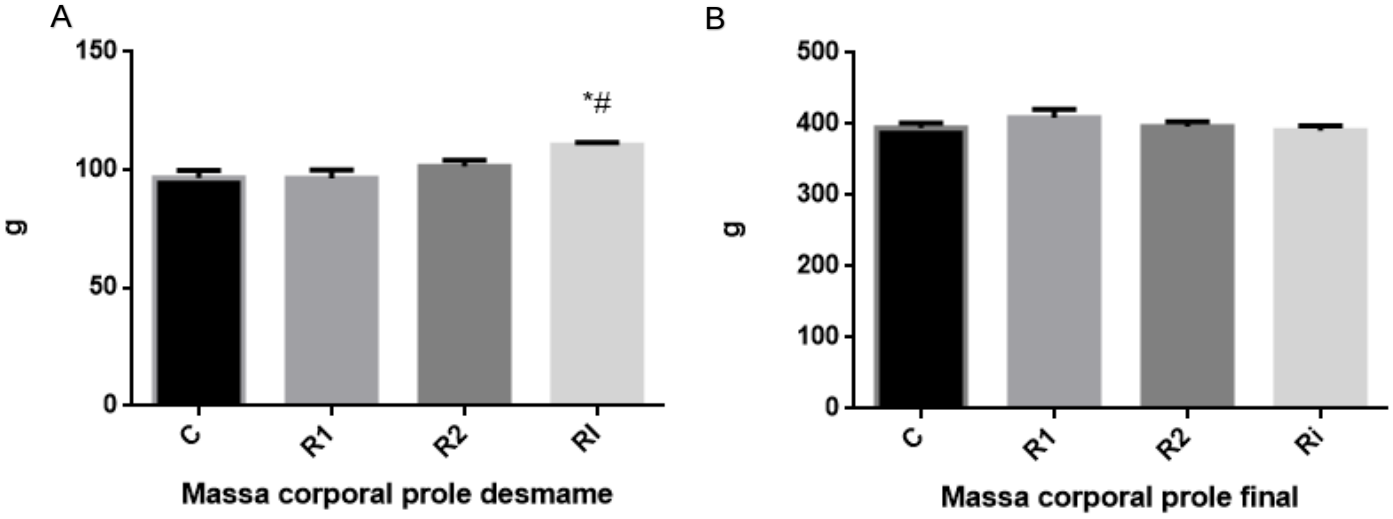

Figura 1: Massa corporal da prole no desmame (A) e ao final do experimento (B) dos grupos Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM e significância para p<0,05. * versus C, # versus R1. n = 8 por grupo.

5.2.4.2 Consumo alimentar

O consumo alimentar entre as proles foi semelhante durante todo o período avaliado (30º ao 100º dia de vida), com consumo maior na prole R2 apenas oitava semana após o desmame.

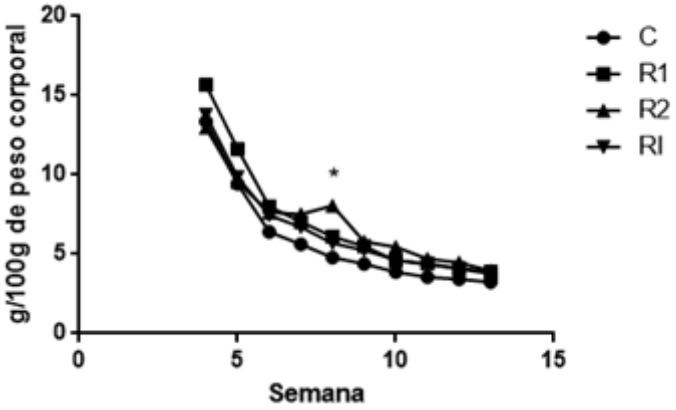

Figura 2: Consumo alimentar semanal dos grupos Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM e significância para p<0,05. * versus C. n = 8 por grupo.

5.2.4.3 Avaliações plasmáticas e adiposidade visceral

O JI nas gestantes promoveu elevação glicêmica e aumento da insulinemia na prole RI, quando comparada à C. O índice HOMA-IR, por sua vez, foi maior nas proles R2 e RI vs. C. Não houve diferença na trigliceridemia, colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL e colesterol VLDL. Não foram verificadas diferenças no tecido adiposo visceral total, MES, RET e EPI. Dados expressos na tabela 1.

Tabela 1: Perfil bioquímico e adiposidade.

	Controle	R1	R2	RI
Glicose (mg/dL)	84,5 ± 6,02	102,0 ± 6,17	102,5 ± 6,64	106,5* ± 6,98
Insulinemia	1,54 ± 0,49	2,40 ± 0,30	2,53 ± 0,25	5,62* ± 0,31
Homa IR	1,10 ± 0,44	2,67 ±0,53	3,11* ±0,34	3,92* ± 0,42
Trigliceridemia (mg/dL)	148,5 ± 14,13	145,2 ± 7,88	133,6 ± 5,30	141,8 ± 8,03
Colesterol total (mg/dL)	131,8± 5,04	139,9 ± 5,26	143,1 ± 5,27	140,6 ± 7,99
Colesterol LDL (mg/dL)	54,3 ± 6,31	61,4 ± 4,78	91,2 ± 4,31	64,7 ± 6,80
Colesterol HDL (mg/dL)	45,5 ± 1,31	49,4 ± 1,90	48,6 ± 2,24	45,1 ± 3,49
Colesterol VLDL (mg/dL)	32,6 ± 1,82	29,0 ± 1,58	26,7 ± 1,06	28,3 ± 1,61
Mesentérico (g)	1,05 ± 0,04	1,14 ± 0,07	0,98 ± 0,04	1,03 ± 0,05
Retroperitoneal (g)	1,18 ± 0,07	1,28 ± 0,12	1,06 ± 0,05	1,23 ± 0,09
Epididimal (g)	1,79 ± 0,11	1,58 ± 0,11	1,48 ± 0,06	1,65 ± 0,10
Adiposidade total (g)	16,24 ± 0,95	17,01 ± 1,18	14,29 ± 0,55	15,80 ± 0,94

Dados expressos como média ± EPM e significância para $p<0,05$. * versus C. n = 8 por grupo.

5.2.4.4 Resposta alimentar à infusão icv de insulina

A prole C respondeu à inibição alimentar induzida pela insulina, todavia, as proles de mães restritas durante o período gestacional não responderam ao efeito anorexígeno da insulina após 24 horas da infusão (Figura 3).

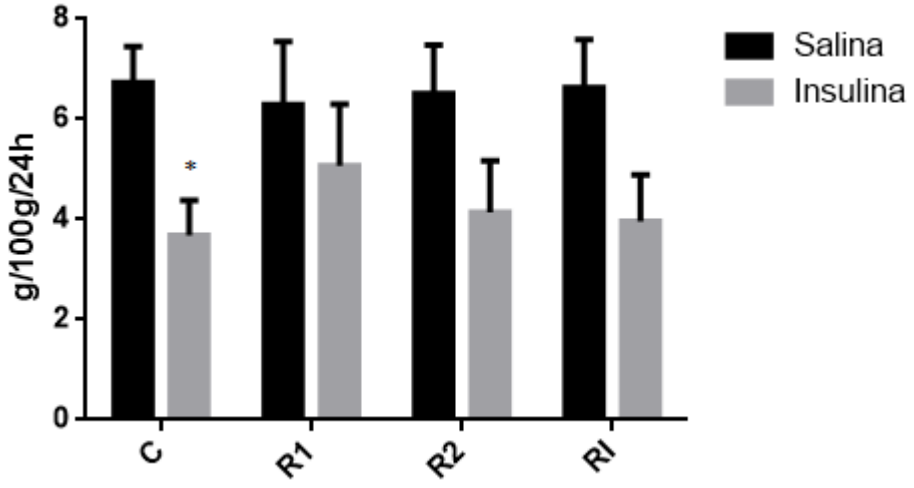

Figura 3: Resposta à infusão intracerebroventricular de insulina dos grupo Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM e significância para p<0,05. * versus salina. n = 8 por grupo.

5.2.4.5 Teor de fosfo-Akt e a expressão do RNAm de FoxO 1 no hipotálamo

A prole R1 apresentou maior teor da proteína fosfo-Akt (p-Akt) comparada à R2 e RI, porém não diferiu do C (Figura 4A). Não foi observada diferença na expressão do fator de transcrição FoxO 1 entre os grupos (Figura 4B).

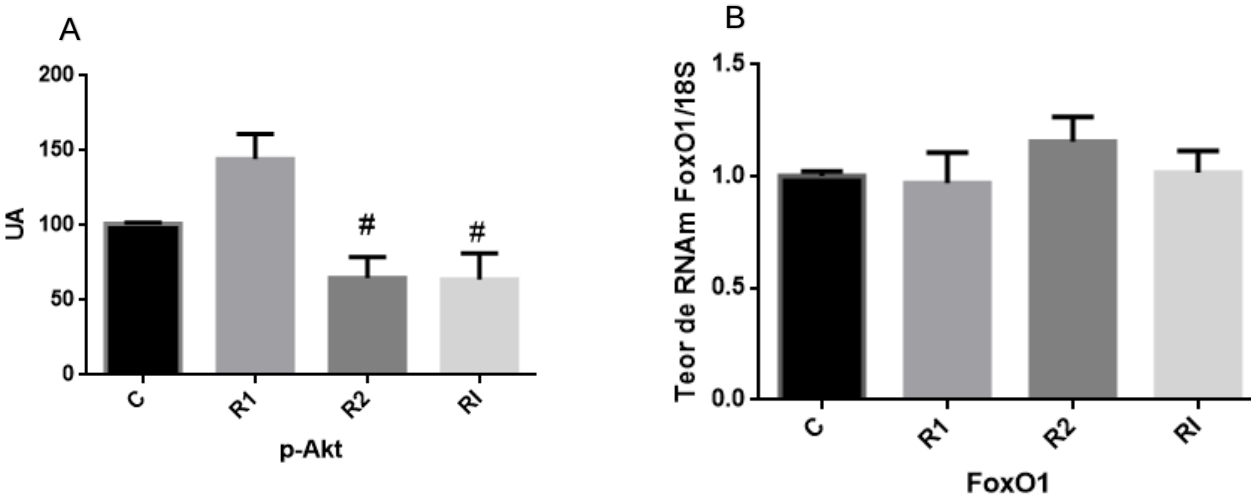

Figura 4: Quantificação da fosfo-Akt (A) e expressão de FoxO 1 (B) hipotalâmicos dos grupos Controle (C), Restrito na primeira metade (R1), Restrito na segunda metade (R2) e Restrito durante toda a gestação (RI). Dados expressos como média ± EPM e significância para p<0,05. # versus R1. n = 6 (p-Akt); n = 9 (FoxO 1). UA – Unidade Arbitrária.

5.2.5 DISCUSSÃO

Verificamos indícios que o JI de ratas grávidas promova alteração na ação periférica e hipotalâmica da insulina na prole macho adulta, sugerindo potencial do JI na gestação para determinar programação metabólica. Os dados do presente trabalho demandam atenção em relação aos humanos, pois mesmo não havendo relação direta entre os modelos animal e humano, independentemente de orientação profissional, as gestantes podem realizar o JI por intercorrência gestacional ou por desejo de controlar o ganho de massa corporal (EWIJK, 2011; FIASCHI; NELSON-PIERCY; TATA, 2016).

As pesquisas com programação metabólica por restrição energética relacionam o baixo peso ao nascer como preditor de alterações metabólicas futuras (GOTARDO et al., 2017; MURAMATSU-KATO et al., 2015). Em geral, estudos de programação metabólica utilizam alimentação hipocalórica na gestação com restrição energética diária de 20 a 70% (BRETON, 2013) do consumo dos animais controles.

O JI na gestação, por sua vez, não promoveu restrição do crescimento intrauterino, o que o diferencia dos modelos de indução de desnutrição materna e intrauterina. Possivelmente, o livre acesso à ração, intercalado ao jejum a 60%, foi determinante para o normal crescimento intrauterino da prole de ratas restritas.

Em consonância com Muramatsu-Kato e colaboradores (2015), não foi identificado excesso de massa corporal na prole adulta que recebeu alimentação *ad libitum* após o desmame. Contudo, estudo aponta que descendentes de mães com restrição alimentar de 60% entre o 11,5 e 17,5 dias de gestação, ao serem expostos à alimentação hiperlipídica, apresentam prejuízos metabólicos e maior ganho de massa corporal que a prole controle com acesso à mesma dieta (HALES; BARKER, 2001). Gluckman e Hanson (2004) sinalizaram a hipótese da resposta adaptativa preditiva, que preconiza perfil obesogênico em situações de discordância entre o ambiente intrauterino restrito no qual a prole foi programada e a abundância alimentar na vida extrauterina, evidenciada pela alimentação hiperlipídica.

Verificamos que a prole RI, ao final da lactação, apresentou maior massa corporal comparado à C e R1. Este comportamento é conhecido como *catch up growth*, e do ponto de vista fisiológico, o crescimento acelerado no início da vida extra uterina, associa-se aos danos futuros característicos da programação metabólica (ALEXANDRE-GOUABAU et al., 2012).

Manuel-Apolinar e colaboradores (2014) encontraram resultados semelhantes ao do presente estudo, ao submeter mães à 50% de restrição energética na gestação não verificaram diferença na massa corporal das proles ao nascer. Porém, a retomada do crescimento extrauterino pela prole de ratas restritas foi maior ao correspondente controle. Por sua vez, Fernandez-Feijoo e colaboradores (2017) encontraram redução na massa corporal ao nascer na prole de mães restritas a 50% no período final da gestação e *catch up growth* após lactação com livre aceso materno à ração.

De fato, 25 a 63% dos casos de diabetes mellitus tipo 2, hipertensão arterial sistêmica e doenças cardiovasculares na vida adulta são repercussões consequentes ao baixo peso ao nascer, combinado ao ganho de peso acelerado da vida neonatal à adolescência (ROSS; DESAI, 2014; BARKER et al., 2002). Claycombe e colaboradores (2013) referem que a retenção do consumo proteico materno se associa ao aumentado número de células adiposas na prole, bem como maior hipertrofia no tecido adiposo omental e subcutâneo, além de hiperplasia no último. O fator de crescimento semelhante à insulina (IGF) pode estar implicado no desenvolvimento da obesidade e suas comorbidades na prole de mães restritas, mas ainda sem elucidação de como ocorre esta indução.

Verificamos elevação de insulinemia na prole RI e, tanto RI quanto R2, apresentaram índice HOMA-IR mais elevado que o C. Este resultado assemelha-se aos dados encontrados por Portha et al (2011) em que a restrição energética no período final da gestação teve maior repercussão na insulina plasmática quando comparada à restrição em períodos mais precoces da gestação. Embora ainda não se tenha elucidado completamente o mecanismo, já está bem estabelecido que a má nutrição materna propicia a resistência insulínica na prole (HALES; BARKER, 2001; BERENDS; OZANNE, 2012).

Possivelmente, outras perturbações associadas à via da insulina seriam observadas em idades mais avançadas da prole, como o aumento da deposição de tecido adiposo, verificado por Dumortier et al (2017). De fato, a resistência à ação da insulina correlaciona-se ao desenvolvimento de desordens cardiometabólicas por propiciar perfil lipídico plasmático aterogênico e promover estado pró-trombótico e póo-inflamatório (PATEL; ABATE, 2013).

Palou e colaboradores (2010) constataram consumo excessivo de ração na prole tratada a partir do 56º dia de vida. Porém, esse estudo aplicou restrição energética contínua de 20% na primeira metade da gestação. Verificamos discreto

episódio de hiperfagia na prole, é possível que, a embora o JI na gestação tenha sido capaz de induzir programação metabólica, ele colabore para prejuízos menos intensos, visto a possibilidade de compensação alimentar materna nos dias de livre acesso a ração.

A inibição da ação anorexígena da insulina, constatada após infusão icv, indica rompimento da homeostase energética e explica, em parte, episódios de hiperfagia. Ademais, evidências confirmam que a restrição energética materna afeta outras vias de controle do consumo alimentar no SNC da prole. Foram encontradas alterações na expressão de receptores de serotonina, leptina e dopamina no hipotálamo da prole macho adulta de ratas restritas a 50% durante a última semana de gestação (MANUEL-APOLINAR et al., 2014), bem como redução de sensibilidade à leptina na prole fêmea aos 21 dias de vida, aumentando a hiperfagia e diminuindo o gasto energético (SHIN et al., 2012).

Estes eventos podem decorrer de comprometimentos da neurogênese, que em ratos se inicia na segunda metade da gestação, sendo entre o 12º e o 16º dias os quais ocorre a formação majoritária de células neurais no núcleo ARC do hipotálamo (RALEVSKI; HORVATH, 2015). Embora na lactação ainda ocorra formação de circuitos neurais (ISHII; BOURET, 2012; ELSON; SIMERLY, 2015), possíveis prejuízos programados no crescimento intrauterino podem comprometer a homeostase energética na vida adulta.

Buscando relacionar a inibição da ação central da insulina na prole de mães restritas com prejuízos na ação da insulina, avaliamos o teor hipotalâmico da proteína Akt fosforilada e a expressão do fator de transcrição FoxO 1. O grupo R1 apresentou elevado teor de p-Akt comparado com R2 e RI, e essas alterações podem ter relevância fisiológica, visto que em situação de jejum espera-se menores concentrações de p-Akt. Dada a incapacidade de todos os grupos tratados responderem à infusão ICV de insulina e aos diferentes períodos de privação alimentar, podemos inferir que pode haver sinalização irregular da via, dependente do período ao qual a mãe foi exposta ao jejum, levando-se em consideração as etapas de desenvolvimento neuronal afetadas (ELSON; SIMERLY, 2015)

Fukami e colaboradores (2012) encontraram, aos dez meses de vida, de prole de mães restritas a 50% a partir do décimo dia de gestação, redução de Akt e p-Akt no hipotálamo de animais recém alimentados. Este fato pode implicar em redução da

saciedade promovida pela insulina no SNC e indicar comprometimento da via em questão em virtude da alimentação materna.

Alterações nos teores de p-Akt sugerem comprometimento da sinalização hipotalâmica de insulina, este resultado, porém, parece não ter contribuído para a modulação da expressão do RNAm de FoxO 1. Ressalta-se que a expressão gênica do FoxO 1 não implica nos teores neuronais do mesmo. De forma que pode haver comprometimento deste componente não verificado pelas análises realizadas neste estudo.

Por sua vez, Sadagurski e colaboradores (2015) expuseram camundongos a super ninhada, modelo de limitação de consumo alimentar na lactação, e verificaram a distribuição de FoxO 1 no núcleo e no citoplasma de neurônios do ARC destes animais aos seis meses. Antes de receberem tratamento com insulina, 50-60% do FoxO 1 encontrava-se no núcleo neuronal, após infusão do hormônio houve redução para 30%, comportamento semelhante ao exibido por animais controle. Os autores concluiram que a super ninhada não foi capaz de interferir na sinalização da insulina hipotalâmica.

Verificamos que o JI na gestação de ratas pode determinar prejuízos na prole. Entretanto, estes são dependentes do período da gestação no qual ocorre a restrição. As proles submetida ao JI na segunda metade e ao longo de toda a gestação apresentaram alterações metabólicas mais intensas. Além de crescimento acelerado durante a lactação, verificamos hiperfagia, alterações na insulinemia, HOMA-IR e possível prejuízo da ação da insulina hipotalâmica devido à redução na resposta alimentar induzida pela insulina. Essas alterações prenunciam prejuízos metabólicos peculiares à programação fetal e sugere condução da prole a comportamento obesogênico na vida adulta tardia.

5.2.6 REFERÊNCIAS

ALEXANDRE-GOUABAU, M. C. F. et al. Postnatal growth velocity modulates alterations of proteins involved in metabolism and neuronal plasticity in neonatal hypothalamus in rats born with intrauterine growth restriction. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2, p. 140–152, 2012.

BARKER, D. J. P. et al. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. **International Journal of Epidemiology**, v. 31, n. 6, p. 1235–1239, dez. 2002.

BERENDS, L. M.; OZANNE, S. E. Early determinants of type-2 diabetes. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 5, p. 569–580, 2012.

BRETON, C. The hypothalamus – adipose axis is a key target of developmental programming by maternal nutritional manipulation. **The Journal of Endocrinology**, v. 216, n. 2, p. 19–31, 2013.

CACHO, J. et al. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 5, p. 1269–1276, 2008.

CARVALHEIRA, J. B. C.; ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrionologia e Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 419–425, 2002.

CLAYCOMBE, K. J. et al. Prenatal Low-Protein and Postnatal High-Fat Diets Induce Rapid Adipose Tissue Growth by Inducing Igf2 Expression in Sprague Dawley Rat Offspring. **Journal of Nutrition**, v. 143, n. 10, p. 1533–1539, 2013.

DUMORTIER, O. et al. Age-dependent control of energy homeostasis by brown adipose tissue in progeny subjected to maternal diet-induced fetal programming. **Diabetes**, v. 66, n. 3, p. 627–639, 2017.

EINARSON, T. R.; PIWKO, C.; KOREN, G. Quantifying the global rates of nausea and vomiting of pregnancy: a meta analysis. **Journal de la Therapeutique des Populations et de la Pharamcologie Clinique**, v. 20, n. 2, p. 171–183, 2013.

ELSON, A. E.; SIMERLY, R. B. Developmental specification of metabolic circuitry. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 39, p. 38–51, 2015.

EWIJK, R. VAN. Long-term health effects on the next generation of Ramadan fasting during pregnancy. **Journal of Health Economics**, v. 30, n. 6, p. 1246–1260, 2011.

FERNANDEZ-FEIJOO, C. D. et al. Influence of catch up growth on spatial learning and memory in a mouse model of intrauterine growth restriction. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, p. 1–15, 2017.

FIASCHI, L.; NELSON-PIERCY, C.; TATA, L. J. Hospital admission for hyperemesis gravidarum: a nationwide study of occurrence, reoccurrence and risk factors among 8.2 million pregnancies. **Human Reproduction**, v. 31, n. 8, p. 1675–1684, ago. 2016.

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

FUKAMI, T. et al. Mechanism of programmed obesity in intrauterine fetal growth restricted offspring: Paradoxically enhanced appetite stimulation in fed and fasting states. **Reproductive Sciences**, v. 19, n. 4, p. 423–430, 2012.

GLASTRAS, S. J. et al. Maternal obesity increases the risk of metabolic disease and impacts renal health in offspring. **Bioscience Reports**, v. 38, p. 1–15, 2018.

GOTARDO, A. T. et al. Maternal feed restriction during pregnancy in Wistar rats: Evaluation of offspring using classical and immunoteratology protocols. **Human and Experimental Toxicology**, v. 36, n. 6, p. 603–615, 2017.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. The thrifty phenotype hypothesis. **British Medical Bulletin**, v. 60, p. 5–20, 2001.

HANSON, M. A; GLUCKMAN, P. D. Early developmental conditioning of later health and disease: physiology or pathophysiology? **Physiological Reviews**, v. 94, n. 4, p. 1027–1076, 2014.

ISHII, Y.; BOURET, S. G. Embryonic birthdate of hypothalamic leptin-activated neurons in mice. **Endocrinology**, v. 153, n. 8, p. 3657–3667, ago. 2012.

KIM, M.-S. et al. Role of hypothalamic FoxO 1 in the regulation of food intake and energy homeostasis. **Nature Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 901–906, 2006.

LEVY, E. et al. The Epigenetic Machinery in Vascular Dysfunction and Hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 19, n. 6, p. DOI: 10.1007/s11906-017-0745-y, 2017.

MANUEL-APOLINAR, L. et al. Role of prenatal undernutrition in the expression of serotonin, dopamine and leptin receptors in adult mice: Implications of food intake. **Molecular Medicine Reports**, v. 9, n. 2, p. 407–412, 2014.

MATOS, R. J. B. et al. Nutrient restriction during early life reduces cell proliferation in the hippocampus at adulthood but does not impair the neuronal differentiation process of the new generated cells. **Neuroscience**, v. 196, p. 16–24, 2011.

MURAMATSU-KATO, K. et al. Undernourishment in utero Primes Hepatic Steatosis in Adult Mice Offspring on an Obesogenic Diet; Involvement of Endoplasmic Reticulum Stress. **Scientific Reports**, v. 5, n. October, p. 1–12, 2015.

PALOU, M. et al. Sexual dimorphism in the lasting effects of moderate caloric restriction during gestation on energy homeostasis in rats is related with fetal programming of insulin and leptin resistance. **Nutrition and Metabolism**, v. 7, p. 1–11, 2010.

PATEL, P.; ABATE, N. Body fat distribution and insulin resistance. **Nutrients**, v. 5, n. 6, p. 2019–2027, 2013.

PORTHA, B.; CHAVEY, A.; MOVASSAT, J. Early-life origins of type 2 diabetes: Fetal programming of the beta-cell mass. **Experimental Diabetes Research**, v. 2011, p. 1–16, 2011.

RALEVSKI, A.; HORVATH, T. L. Developmental programming of hypothalamic neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 39, p. 52–58, 2015.

ROPELLE, E. R. et al. Inhibition of hypothalamic FoxO 1 expression reduced food intake in diet-induced obesity rats. **Journal of Physiology**, v. 587, n. 10, p. 2341–2351, 2009.

ROSS, M. G.; DESAI, M. Developmental Programming of Appetite / Satiety. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 64, n. suppl 1, p. 36–44, 2014.

SADAGURSKI, M. et al. Transient early food restriction leads to hypothalamic changes in the long-lived crowded litter female mice. **Physiological Reports**, v. 3, n. 4, p. 1–14, 2015.

SAVITRI, A. I. et al. Ramadan fasting and newborn ’ s birth weight in pregnant Muslim women in The Netherlands. **The British Journal of Nutrition**, v. 112, p. 1503–1509, 2014.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, abr. 2000.

SHIN, B.-C. et al. Pre- and Postnatal Calorie Restriction Perturbs Early Hypothalamic Neuropeptide and Energy Balance. **Journal of Neuroscience Research**, v. 11990, n. 6, p. 1169–1182, 2012.

6 CONCLUSÃO

- O JI em dias alternados induziu episódios de hiperfagia em fêmeas W*istar* prenhas nos dias de livre acesso ao consumo de ração.
- Fêmeas submetidas ao JI durante a gestação, seguida de livre acesso à ração na lactação, evidenciaram aumento da deposição de tecido adiposo visceral total.
- A prole macho, descendente de fêmeas *Wistar* expostas ao JI durante a gestação, apresentou elevação plasmática de insulina e resistência a ação periférica do hormônio na vida adulta jovem.
- A resposta anorexígena da insulina no hipotálamo foi comprometida na prole macho na vida adulta jovem.
- O JI em dias alternados induziu à programação metabólica na prole macho. Aos 100 dias de vida já são observadas alterações fisiológicas pró-obesidade nestes animais.

7 REFERÊNCIAS

ABDEL-HAKEEM, A. K. et al. Mechanisms of impaired nephrogenesis with fetal growth restriction: altered renal transcription and growth factor expression. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 199, n. 3, 2008.

AKSUNGAR, F. B. et al. Comparison of Intermittent Fasting Versus Caloric Restriction in Obese Subjects: A Two Year Follow-Up. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, v. 21, n. 6, p. 681–685, 2017.

ALMOND, D. et al. Health Capital and the Prenatal Environment: The effect of maternal fasting during pregnancy. **National Bureau of Economic Research**, v. 14428, p. 1–79, 2008.

AZEVEDO, F.; IKEOKA, D.; CARAMELLI, B. Review article Effects of intermittent fasting on metabolism in men. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 2, p. 167–173, 2013.

BARKER, D. J. . et al. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. **The Lancet**, v. 341, n. 8850, p. 938–941, 1993.

BARKER, D. Fetal undernutrition and disease in later life. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 105–112, 1997.

BARKER, D.; OSMOND, C. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales. **The Lancet**, v. 327, p. 1077–1081, 1986.

BARNOSKY, A. R. et al. Intermittent fasting vs daily calorie restriction for type 2 diabetes prevention: A review of human findings. **Translational Research**, v. 164, n. 4, p. 302–311, 2014.

BAUMEIER, C. et al. Biochimica et Biophysica Acta Caloric restriction and intermittent fasting alter hepatic lipid droplet proteome and diacylglycerol species and prevent diabetes in NZO mice. **BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 5, p. 566–576, 2015.

BILSEN, L. A. VAN et al. Predictors of Ramadan fasting during pregnancy. **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 6, n. 4, p. 267–275, 2016.

BOURET, S. G. Early life origins of obesity: Role of hypothalamic programming. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 48, n. SUPPL. 1, p. 31–38, 2009.

BOURET, S. G. Leptin, nutrition, and the programming of hypothalamic feeding

circuits. **Nestle Nutrition Workshop Series. Paediatric Programme**, v. 65, p. 25–29, 2010.

BRONISZ, A.; OZOROWSKI, M.; HAGNER-DERENGOWSKA, M. Pregnancy Ketonemia and Development of the Fetal Central Nervous System. **International Journal of Endocrinology**, v. 4, p. 1242901, 2018.

BURTON, G. J.; FOWDEN, A. L. Review: The placenta and developmental programming: Balancing fetal nutrient demands with maternal resource allocation. **Placenta**, v. 33, n. SUPPL., p. S23–S27, 2012.

CACHO, J. et al. Validation of simple indexes to assess insulin sensitivity during pregnancy in Wistar and Sprague-Dawley rats. **AJP: Endocrinology and Metabolism**, v. 295, n. 5, p. 1269–1276, 2008.
CARROLL, D. et al. Systolic blood pressure reactions to acute stress are associated with future hypertension status in the Dutch Famine Birth Cohort Study. **International Journal of Psychophysiology**. n. 85, v. 2, p. 270 - 273, 2012.

CHARLES, M.; DELPIERRE, C.; BRÉANT, B. Le concept des origines développementales de la santé. **Médecine Sciences**, v. 32, p. 15–20, 2016.

CHORTATOS, A. et al. Nausea and vomiting in pregnancy: Associations with maternal gestational diet and lifestyle factors in the Norwegian Mother and Child Cohort Study. **BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 120, n. 13, p. 1642–1653, 2013.

CUI, H.; LOPEZ, M.; RAHMOUNI, K. The cellular and molecular bases of leptin and ghrelin resistance in obesity. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 338–351, 2017.

DE ROOIJ, S. R. et al. Glucose tolerance at age 58 and the decline of glucose tolerance in comparison with age 50 in people prenatally exposed to the Dutch famine. **Diabetologia**, v. 49, n. 4, p. 637–643, 2006.

DE ROOIJ, S. R. Blunted cardiovascular and cortisol reactivity to acute psychological stress: A summary of results from the Dutch Famine Birth Cohort Study. **International Journal of Psychophysiology**, v. 90, n. 1, p. 21–27, 2013.

DEARDEN, L.; OZANNE, S. E. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 39, p. 3–16, 2015.

DONNELLY, J. E. et al. Appropriate Physical Activity Intervention Strategies for Weight Loss and Prevention of Weight Regain for Adults. **American College of Sports Medicine**, v. 109, n. 2, p. 459–471, 2009.

DRESSLER, H.; SMITH, C. Food choice, eating behavior, and food liking differs between lean/normal and overweight/obese, low-income women. **Appetite**, v. 65, p. 145–152, 2013.

FARIS, A. E.; KACIMI, S.; AL-KURD, R. A. Intermittent fasting during Ramadan attenuates proinflammatory cytokines and immune cells in healthy subjects. **Nutrition Research**, v. 32, n. 12, p. 947–955, 2012.

GARCIA-SOLIS, P. et al. Thyroid hormones and obesity: a known but poorly understood relationship. **Endokrynologia Polska**, v. 69, n. 3, p. 292–303, 2018.

GLUCKMAN, P. D. et al. Towards a new developmental synthesis: adaptive developmental plasticity and human disease. **The Lancet**, v. 373, n. 9675, p. 1654–1657, 2009.

GROPP, E. et al. Agouti-related peptide-expressing neurons are mandatory for feeding. **Nature Neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 1289–1291, 2005.

GROSS, D. N.; WAN, M.; BIRNBAUM, M. J. The role of FoxO in the regulation of metabolism. **Current Diabetes Reports**, v. 9, n. 3, p. 208–214, 2009.

HALBERG, N. et al. Effect of intermittent fasting and refeeding on insulin action in healthy men. **Journal of Applied Physiology**, v. 99, n. 6, p. 2128–2136, dez. 2005.

HALES, C. N.; BARKER, D. J. P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis. **International Journal of Epidemiology**, v. 42, n. 5, p. 1215–1222, 2013.

IMHOFF-KUNSCH, B.; MARTORELL, R. Nutrition interventions during pregnancy and maternal, newborn and child health outcomes. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 26, n. SUPPL. 1, p. 1–3, 2012.

INSTITUTE OF MEDICINE OF THE NATIONAL ACADEMIES. Dietary Reference Intakes: Macronutrients Nutrient. 2005. Disponível em: http://www.iom.edu/~/media/Files/Activity%20Files/, 2015

KIM, H. J. et al. Overexpression of FoxO 1 in the hypothalamus and pancreas causes obesity and glucose intolerance. **Endocrinology**, v. 153, n. 2, p. 659–671, 2012.

KRASHES, ET AL. Rapid versus delayed stimulation of feeding by the endogenously released AgRP neuron mediators, GABA, NPY and AgRP. **Cell Metabolism**, v. 18, n. 4, p. 247–253, 2013.

KWON, E. J.; KIM, Y. J. What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 60, n. 6, p. 506–519, 2017.

LEE, C.; LONGO, V. Dietary restriction with and without caloric restriction for healthy aging. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 1–7, 2016.

LEE, S. H. et al. Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. **Molecular Metabolism**, v. 5, n. 8, p. 589–601, 2016.

LÍBERA, B. DELLA et al. Avaliação da assistência pré-natal na perspectiva de puérperas e profissionais de saúde Evaluation of prenatal assistance in the point of view of puerperas and hetalth care professionals. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, n. 12, p. 4855–4864, 2011.

LUMEY, L. H. et al. Lipid profiles in middle-aged men and women after famine exposure during gestation: The Dutch Hunger Winter Families Study. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89, n. 6, p. 1737–1743, 2009.

LUQUET, S. et al. NPY/AgRP neurons are essential for feeding in adult mice but can be ablated in neonates. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 683–685, out. 2005.

MARTIN-GRONERT, M. S. et al. 5-HT2A and 5-HT2C receptors as hypothalamic targets of developmental programming in male rats. **Disease Models & Mechanisms**, v. 9, n. 4, p. 401–412, abr. 2016.

MILLS, J. L. Strategies for Preventing Folate-Related Neural Tube Defects Supplements, Fortified Foods, or Both? **Jama**, v. 312, n. 2, p. 144–145, 2017.

MOHANY, M. et al. A new model for fetal programming : maternal Ramadan-type fasting programs nephrogenesis. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 9, n. 3, p. 1–12, 2018.

MORTON, G. J. et al. Central nervous system control of food intake and body weight. **Nature**, v. 443, n. 7109, p. 289–295, 2006.

NISWENDER, K. D. et al. Insulin Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase in the Hypothalamic Arcuate Nucleus. **Diabetes**, v. 52, n. 2, p. 227–231, 2003.

NNAM, N. M. Improving maternal nutrition for better pregnancy outcomes. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 74, n. 4, p. 454–459, 2015.

ORTIGA-CARVALHO, T. M. et al. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Axis. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1387–1428, jun. 2016.

PATTERSON, R. E. et al. Intermittent Fasting and Human Metabolic Health. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 115, n. 8, p. 1203–1212, 2015.

PERRY, B.; WANG, Y. Appetite regulation and weight control: The role of gut hormones. **Nutrition and Diabetes**, v. 16, n. 2, p. 26-27, 2012.

PORTRAIT, F.; TEEUWISZEN, E.; DEEG, D. Early life undernutrition and chronic diseases at older ages: The effects of the Dutch famine on cardiovascular diseases and diabetes. **Social Science & Medicine**, v. 73, n. 5, p. 711–718, 2011.

RAMAMOORTHY, T. G. et al. Developmental programming of hypothalamic neuronal circuits: Impact on energy balance control. **Frontiers in Neuroscience**, v. 9, p. 1–16, 2015.

REMMERS, F.; DELEMARRE-VAN DE WAAL, H. A. Developmental programming of energy balance and its hypothalamic regulation. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 2, p. 272–311, 2011.

RETENTION, M. et al. Intermittent Fasting Promotes Fat Loss with Lean Y Gene Expression in Diet-Induced Obese Male Mice. **Endocrinology**, v. 157, n. 2, p. 1–14, 2016.

RODRIGUES, K.C.D.C. et al. The Role of Physical Exercise to Improve the Browning of White Adipose Tissue via POMC Neurons. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v.12, n.88, p. 1–7, 2018.

SCHOLTE, R. S.; VAN DEN BERG, G. J.; LINDEBOOM, M. Long-run effects of gestation during the Dutch Hunger Winter famine on labor market and hospitalization outcomes. **Journal of Health Economics**, v. 39, p. 17–30, 2015.

SCHULZ, L. C. The Dutch Hunger Winter and the developmental origins of health and disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 39, p. 16757–16758, 2010.

SCHWARTZ, M. W. et al. Central nervous system control of food intake. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 661–671, abr. 2000.

SHIN, B.-C. et al. Pre- and Postnatal Calorie Restriction Perturbs Early Hypothalamic Neuropeptide and Energy Balance. **Journal of Neuroscience Research**, v. 11990, n. 6, p. 1169–1182, 2012.

SUBRAMANIAPILLAI, M. O.; MCINTYRE, R. S. A Review of the Neurobiology of Obesity and the Available Pharmacotherapies. **CNS Spectrums**, v. 22, n. 1, p. 29–38, 2017.

TENG, N. I. M. F. et al. Efficacy of fasting calorie restriction on quality of life among aging men. **Physiology and Behavior**, v. 104, n. 5, p. 1059–1064, 2011.

TINSLEY, G. M.; LA BOUNTY, P. M. Effects of intermittent fasting on body composition and clinical health markers in humans. **Nutrition Reviews**, v. 73, n. 10, p. 661–674, 2015.

TURK, M. et al. Randomized Clinical Trials of Weight-Loss Maintenance: A Review. **Journal of Cardiovascular Nursing**, v. 24, n. 1, p. 58–80, 2009.

VARADY, K. A. et al. Effects of modified alternate-day fasting regimens on adipocyte size , triglyceride metabolism , and plasma adiponectin levels in mice. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 10, p. 2212–2219, 2007.

VARADY, K. A. Intermittent versus daily calorie restriction : which diet regimen is more effective for weight loss ? **Obesity Reviews**, v. 12, n. 7, p. 593–601, 2011.

VARADY, K. A. et al. Alternate day fasting for weight loss in normal weight and overweight subjects : a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–8, 2013.

VELLOSO, L. A. The hypothalamic control of feeding and thermogenesis: implications on the development of obesity. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 165–176, abr. 2006.

VERBERG, M. F. G. et al. Hyperemesis gravidarum, a literature review. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 5, p. 527–539, 2005.

VILCA, C.M.C. Resposta alimentar a infusão intracelebroventricular de anorexígenos e expressão de ObRb e FoxO 1 em hipotálamo de ratas sob restrição alimentar intermitente. 2017.
Dissertação (Mestre). Programa de Pós Graduação em Nutrição Humana, Instituto Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

WELLS, J. C. K. Worldwide variability in growth and its association with health: Incorporating body composition, developmental plasticity, and intergenerational effects. **American Journal of Human Biology**, v. 29, n. 2, p. doi: 10.1002/ajhb.22954, 2017.

WHITEHOUSE, A. J. O. et al. Symptom severity in autism spectrum disorder is related to the frequency and severity of nausea and vomiting during pregnancy : a

retrospective case-control study. **Molecular Autism**, v. 9, n. 37, p. 1–8, 2018.

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS UFRJ-MACAÉ
Professor Aloísio Teixeira

Macaé, 17 de Dezembro de 2015

Prezado

A Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira certifica que o projeto sob sua coordenação e intitulado "Efeito de nutrientes, plantas, algas e atividade física sobre a lipogênese, regulação da ingestão alimentar, programação metabólica e marcadores de síndrome metabólica.", onde é previsto protocolo com utilização de animais, foi aprovado por esta comissão, sob o número de referência MAC030 possuindo validade de 4 (quatro) anos.

Atenciosamente,

Prof. Andre Gustavo Calvano Bonavita
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
SIAPE: 2738212
Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira

Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus UFRJ – Macaé Prof. Aloísio Teixeira
Rua Aluízio da Silva Gomes, 50 - Granja dos Cavaleiros, Macaé - RJ - CEP: 27930-560
Tel. (22) ??? E-mail: caua@macae.ufrj.br