

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

**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO TERAPÊUTICO
DA METFORMINA DURANTE ADOLESCÊNCIA
SOBRE AS DISFUNÇÕES METABÓLICAS
OBSERVADAS EM RATOS ADULTOS
AMAMENTADOS POR MÃES OBESAS**

ALINE MILENA DANTAS RODRIGUES

Sinop, Mato Grosso
Julho, 2024

ALINE MILENA DANTAS RODRIGUES

**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO TERAPÊUTICO
DA METFORMINA DURANTE ADOLESCÊNCIA
SOBRE AS DISFUNÇÕES METABÓLICAS
OBSERVADAS EM RATOS ADULTOS
AMAMENTADOS POR MÃES OBESAS**

Orientador: Prof. Dr. Júlio Cezar de Oliveira
Coorientador: Prof. Dr. Paulo Cezar de Freitas Mathias

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

Sinop, Mato Grosso
Julho, 2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

R696e Rodrigues, Aline Milena Dantas.
Estudo do potencial efeito terapêutico da metformina durante adolescência sobre as disfunções metabólicas observadas em ratos adultos amamentados por mães obesas [recurso eletrônico] / Aline Milena Dantas Rodrigues. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 85 f., il. color., pdf). -- 2024.

Orientadora: Júlio Cezar de Oliveira.
Coorientadora: Paulo Cezar de Freitas Mathias.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências em Saúde, Sinop, 2024.
Modo de acesso: World Wide Web: <https://ri.ufmt.br>.
Inclui bibliografia.

1. Obesidade. 2. Programação Metabólica. 3. Metformina. 4. Homeostase glicêmica. I. de Oliveira, Júlio Cezar, *orientador*. II. Mathias, Paulo Cezar de Freitas, *coorientador*. III. Título.

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

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



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

TÍTULO: "Estudo do potencial efeito terapêutico da metformina durante adolescência sobre as disfunções metabólicas observadas em ratos adultos amamentados por mães obesas"

AUTOR (A): Mestranda Aline Milena Dantas Rodrigues

Dissertação defendida e aprovada em **12/07/2024**.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

1. Presidente Banca - Júlio Cezar de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

2. Orientador(a) - Júlio Cezar de Oliveira

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

3. Examinador(a) Externo(a) - Patricia Cristina Lisboa

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ)

4. Examinador(a) Interno(a) - Oyane Almeida Gama Sales

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

5. Examinador(a) Suplente - Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca de Queiroz

Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso

6. Examinador(a) Suplente - Rosiane Aparecida Miranda

Instituição: Universidade do Estado do Rio de Janeiro

SINOP, 12/07/2024.



Documento assinado eletronicamente por **JULIO CEZAR DE OLIVEIRA, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 12/07/2024, às 17:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Cristina Lisboa da Silva registrado(a) civilmente como PATRICIA CRISTINA LISBOA DA SILVA, Usuário Externo**, em 13/07/2024, às 12:43, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **LOYANE ALMEIDA GAMA SALES, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso**, em 15/07/2024, às 15:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufmt.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **6934422** e o código CRC **6E97E9A6**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, **Laura e Carlos**, por acreditarem em mim e sempre me incentivarem, sem esse apoio não teria trilhado tantos bons caminhos. Ao meu tio, **Urandir Junior**, por me introduzir e incentivar no mundo acadêmico e da pesquisa. Ao meu irmão **Enzo** e meu namorado **Gabriel**, por todo o apoio, tanto emocional como físico, auxiliando em processos do presente projeto.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório, **Mateus, Manoela, Luis Paulo, Karoline, Ana Caroline, Maria Eduarda, Sabrina, Antonio, Thiara e Isabelle** por toda ajuda e conhecimento compartilhado. Agradeço também ao Laboratório de Doenças Metabólicas e Cardiovasculares do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS).

Agradeço imensamente as professoras **Lilian e Jocemara** que me incentivaram durante a graduação, e aos professores da pós-graduação, por todos os ensinamentos e companheirismo compartilhados. E ao meu orientador **Júlio Cezar de Oliveira**, por todo auxílio, conhecimento e pela oportunidade de desenvolver este projeto e abrir tantas portas para o meu desenvolvimento acadêmico. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro fornecido a mim, através do Programa Demanda Social.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui, meu eterno agradecimento e admiração.

RESUMO

Considerada uma das principais disfunções metabólicas, muitas vezes associada à insultos fisiológicos ocorridos em estágios precoces da vida (intrauterina, lactação e adolescência), a obesidade é um dos principais problemas de saúde no mundo. A nutrição da prole nas fases iniciais da vida é crucial para um desenvolvimento saudável, fato que a depender da qualidade nutricional materna pode levá-los ao desenvolvimento de doenças metabólicas no futuro. Neste âmbito, a metformina é um importante fármaco no tratamento da obesidade. Nesse trabalho objetivou-se avaliar o papel do tratamento com metformina, apenas durante a adolescência, como possível desprogramador das disfunções metabólicas induzidas pela obesidade materna durante lactação, analisando o efeito sexo-dependente tanto da obesidade materna como da metformina na prole. Durante a lactação, ratas Wistar amamentando 8 filhotes (4 machos e 4 fêmeas) foram alimentadas com dieta hipercalórica (4.589 kcal) mais solução de sacarose à 10% (grupo Obese), enquanto ratas controle ingeriram dieta comercial (grupo Cont). Avaliou-se o peso e ingestão materna, bem como a composição do leite, composição corporal e parâmetros bioquímicos. Durante a lactação, avaliou-se a evolução ponderal e ingestão de leite pela prole. Dos 30 aos 60 dias de vida, metade da prole foi tratada com metformina (250 mg/kg em água de beber; grupos Cont-Met e Ob-Met), enquanto a outra metade bebeu somente água (grupos Cont e Ob). Os ratos foram submetidos a testes de intolerância à glicose (ipGTT) e insulina (ipITT), e aos 120 dias de vida foram eutanasiados para coleta tecidual (massa magra e massa gorda) e sangue para posterior avaliação da composição corporal, perfil lipídico e função hepática. Em comparação ao grupo Cont, o grupo Obese consumiu mais calorias, e ao final da lactação, apresentou aumento no peso corporal, peso do fígado e adiposidade ($P<0,05$), bem como aumento de triglicerídeos, índice TyG, AST, ALT e nos marcadores de estresse oxidativo (TBARS, carbonil e CAT hepática), associado a redução no colesterol HDL ($P<0,05$). O leite das ratas Obese apresentou-se mais calórico em comparação ao do grupo Cont ($P<0,01$). Os filhotes de mães Obese (machos e fêmeas) consumiram mais leite que os filhotes Cont e apresentaram maior ganho de peso ($P<0,01$), sendo este mais precoce nos machos. O ganho de peso dos ratos Ob-Met, durante e após o tratamento com metformina, foi reduzido em 10%, em comparação aos Cont ($P<0,05$). Os filhotes machos Ob apresentaram aumento no colesterol total, triglicerídeos, glicose, AST e ALT, enquanto os ratos Ob-Met apresentaram redução desses parâmetros. As fêmeas Ob apresentaram aumento nos triglicerídeos, colesterol VLDL, enquanto as Ob-Met apresentaram redução. As ratas Ob-Met apresentaram hipoglicemia em relação as Ob, o que não ocorreu em machos. Conclui-se que ratas lactantes ingerindo dieta hipercalórica, desenvolve obesidade associada à disfunção hepática e leite mais calórico, por conseguinte seus filhotes, especialmente os machos, consomem mais leite e ganham peso mais precocemente, desenvolvendo obesidade e disfunção metabólica em longo prazo. A metformina reduz o ganho de peso e melhora os parâmetros bioquímicos, mostrando eficácia na redução de riscos metabólicos associados à obesidade materna.

Palavras-chave: Obesidade; programação metabólica; homeostase glicêmica.

ABSTRACT

Considered one of the main metabolic dysfunctions, often associated with physiological insults occurring in early life (intrauterine, lactation and adolescence), obesity is one of the main health problems worldwide. The nutrition of offspring in early life is crucial for healthy development, a fact that, depending on the maternal nutritional quality, can lead to the development of metabolic diseases in later life. In this regard, metformin is an important drug in the treatment of obesity. This study aimed to evaluate the role of metformin treatment, only during adolescence, as a possible deprogrammer of metabolic dysfunctions induced by maternal obesity during lactation, analyzing the sex-dependent effect of both maternal obesity and metformin in the offspring. During lactation, Wistar rats nursing 8 pups (4 males and 4 females) were fed a hypercaloric diet (4,589 kcal) plus 10% sucrose solution (Obese group), while control rats fed a rodent chow (Cont group). Maternal weight and intake, as well as milk composition, body composition and biochemical parameters were assessed. During lactation, weight gain and milk intake of the offspring were evaluated. From 30 to 60 days-old, half of the offspring were treated with metformin (250 mg/kg in drinking water; Cont-Met and Ob-Met groups), while the other half drank only water (Cont and Ob groups). The rats were subjected to glucose intolerance (ipGTT) and insulin (ipITT) tests, and at 120 days-old they were euthanized for tissue collection (lean mass and fat mass) and blood for later evaluation of body composition, lipid profile and liver function. Compared to the Cont group, Obese group consumed more calories and, at the end of lactation, showed an increase in body weight, liver weight and adiposity ($P<0.05$), as well as an increase in triglycerides, TyG index, AST, ALT and oxidative stress markers (TBARS, carbonyl and hepatic CAT), associated with reduced HDL cholesterol ($P<0.05$). The milk of Obese rats was more caloric compared to that of the Cont group ($P<0.01$). The offspring of Obese mothers (males and females) consumed more milk than the Cont offspring and showed greater weight gain ($P<0.01$), which was earlier in males. The weight gain of Ob-Met rats, during and after treatment with metformin, was reduced by 10%, compared to Cont ($P<0.05$). Male Ob pups showed increase in total cholesterol, triglycerides, glucose, AST and ALT, while Ob-Met rats showed reduction in these parameters. Female Ob rats showed increase in triglycerides and VLDL cholesterol, while Ob-Met rats showed reduction. Ob-Met rats presented hypoglycemia compared to Ob rats, which did not occur in males. In conclusion, lactating rats fed a hypercaloric diet develop obesity associated with liver dysfunction and more caloric milk, therefore their pups, especially males, consume more milk and gain body weight earlier, developing obesity and metabolic dysfunction as long-term consequence. Metformin reduces weight gain and improves biochemical parameters, showing efficacy in reducing metabolic risks associated with maternal obesity.

Keywords: Obesity; metabolic programming; glucose homeostasis

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Aleitamento materno.....	6
1.2 Programação metabólica.....	7
1.3 Obesidade.....	8
1.4 Ação da insulina na manutenção da homeostase glicêmica.....	10
1.5 Metformina e seu papel na manutenção da homeostase energética.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 MATERIAIS E METÓDOS.....	14
3.1 Condições éticas e ambientação animal.....	14
3.2 Modelo experimental.....	14
3.3 Coleta e análise de leite materno.....	15
3.4 Crematócrito do leite.....	16
3.5 Avaliação do efeito da dieta hipercalórica sobre composição corporal materna.....	16
3.6 Avaliação do estresse oxidativo.....	17
3.6.1 Quantificação da atividade da CAT.....	17
3.6.2 Quantificação da atividade da GST.....	17
3.6.3 Quantificação do TBARS.....	18
3.6.4 Quantificação dos níveis de carbonilação de proteínas.....	18
3.7 Avaliação da ingestão de leite e evolução ponderal da prole durante lactação.....	18
3.8 Tratamento com metformina na adolescência.....	18
3.9 Avaliação da homeostase glicêmica na prole.....	19
3.10 Avaliação da composição corporal.....	20
3.11 Análises estatísticas.....	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Evolução ponderal e ingestão alimentar e hídrica materna durante lactação.....	21
4.2 Composição corporal materna.....	22
4.3 Parâmetros bioquímicos das matrizes.....	23
4.4 Avaliação da função hepática materna.....	23
4.5 Composição de leite materno.....	24

4.6 Avaliação da evolução ponderal e ingestão de leite da prole durante lactação.....	26
4.7 Evolução ponderal, ingestão alimentar e consumo hídrico dos animais pós desmamae	28
4.8 Avaliação do peso de órgãos.....	34
4.9 Parâmetros bioquímicos aos 120 dias.....	36
4.9 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipGTT e ipITT.....	39
5 DISCUSSÃO.....	43
6 CONCLUSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
8 ARTIGO.....	56

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aleitamento materno

O aleitamento materno é amplamente reconhecido como sendo a fonte nutricional imprescindível ao bom desenvolvimento do neonato em diferentes espécies de mamíferos, desempenhando um papel crucial na promoção da saúde e melhor qualidade de vida (Lisboa, Miranda *et al.*, 2021). Alterações na composição dos macronutrientes, micronutrientes e/ou em níveis de anticorpos, alguns hormônios e fatores de crescimento do leite materno têm sido associadas ao surgimento de doenças crônicas não-transmissíveis na vida adulta (Lisboa, Miranda *et al.*, 2021). Cada vez mais vem se explorando as conexões entre o comportamento de amamentação e o padrão de saúde infantil, tais evidências veem consolidando a amamentação como o "padrão ouro", ressaltando sua importância como pilar essencial para a saúde e o bem-estar da criança, independentemente do contexto social e econômico (Dieterich, Felice *et al.*, 2013).

O leite materno é composto por macro e micronutrientes cujas concentrações variam no decorrer da amamentação. Essas variações acontecem em resposta às necessidades metabólicas apresentadas pelo organismo do bebê, o que se dá através de mecanismos reguladores neuroendócrinos (Badillo-Suarez, Rodriguez-Cruz *et al.*, 2017).

Além dos macro e micronutrientes, há também no leite materno hormônios metabólicos importantes para o desenvolvimento do neonato, dentre eles pode-se citar a leptina, insulina, adiponectina, obestatina, grelina, resistina, apelina, nesfatina, irisina, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) que são essenciais para um desenvolvimento saudável da criança, no que tange a maturação de vias neuronais hipotalâmicas envolvidas na sinalização neuroendócrina responsável por regular o balanço energético (Badillo-Suarez, Rodriguez-Cruz *et al.*, 2017).

Prontamente absorvido pelo organismo, o leite materno possui baixa concentração de solutos e oferece uma maior disponibilidade de minerais, vitaminas e proteínas, bem como atua como hídrica imprescindível ao neonato. Além disso, a amamentação está relacionada a um menor risco de ocorrência de infecções em bebês (Colombo, Crippa *et al.*, 2018), sendo a alimentação recomendada como exclusiva para o bebê recém-nascido durante os primeiros seis meses de vida.

Quanto aos benefícios contra o desenvolvimento de doenças crônicas não-transmissíveis, tais como a proteção contra obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2, por exemplo, a presença em níveis adequados dos hormônios metabólicos leptina (Bouret, Draper *et al.*, 2004), insulina (Chong, Vogt *et al.*, 2015) e grelina (Steculorum, Collden *et al.*, 2015; Parrela, Borkenhagen *et al.*, 2022), por exemplo, são cruciais uma vez que desempenham um papel significativo na maturação de conexões neurais hipotalâmicas que podem evitar os efeitos de longo prazo oriundos da programação metabólica (Badillo-Suarez, Rodriguez-Cruz *et al.*, 2017).

1.2. Programação metabólica

O estudo para o entendimento dos possíveis mecanismos subjacentes à programação metabólica, os quais constituem o chamado conceito DOHaD, abreviação do termo inglês *Developmental Origins of Health and Disease* (Uauy, Kain *et al.*, 2011), no qual se postula que insultos diversos (dentre estas alterações nutricionais e hormonais), particularmente em períodos críticos do desenvolvimento tais como o estágio intrauterino e a lactação, são responsáveis por modular vias neuroendócrinas afetando o padrão de transcrição gênica (Aranda, Mas *et al.*, 2015) e processos fisiológicos que levam ao surgimento de distúrbios metabólicos diversos, tais como diabetes *mellitus* tipo 2, hipertensão e obesidade.

Durante a gestação, a mulher passa por uma série de mudanças físicas e metabólicas significativas, oferecendo uma oportunidade única para programar a saúde futura tanto da mãe quanto do bebê (Parrettini, Caroli *et al.*, 2020). Os efeitos de longo prazo resultantes da programação perinatal têm sido observado em ratos filhos de mães que foram submetidas tanto à ingestão de dieta hipercalórica (De Jong, Barrand *et al.*, 2018) como à desnutrição (Miranda, De Lima *et al.*, 2022).

Contudo, os primeiros estudos fazendo associação entre peso ao nascer e o surgimento de hipertensão, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 na vida adulta foram desenvolvidos por David Barker, renomado pesquisador no campo da epidemiologia clínica que contribuiu grandemente para o atual paradigma DOHaD. Em suma, em sua hipótese, David Barker propôs que o baixo peso ao nascer seria um forte marcador para o surgimento de hipertensão, obesidade e diabetes *mellitus* tipo 2 na vida adulta (Barker, Hales *et al.*, 1993; Mi, Law *et al.*, 2000; Osmond e Barker, 2000; Barker, 2001), uma vez que o ambiente intrauterino influencia o feto em desenvolvimento, de modo a modular o padrão de transcrições gênica (Burdge e Lillycrop, 2010; Tiffon, 2018), deixando-o

vulnerável ao desenvolvimento de disfunções do metabolismo energético duradouras (Weaver, Cervoni *et al.*, 2004; Cooper, 2013).

Nesse contexto, a hipótese de Barker, também conhecida como hipótese do fenótipo poupador, que teve como base os estudos realizados com descendentes de mães que viveram a trágica experiência da fome Holandesa, ocorrida em 1944 (Roseboom, Van Der Meulen *et al.*, 2001; Van Abeelen, Veenendaal *et al.*, 2012), foi posteriormente evidenciada através de estudos epigenéticos em humanos (Heijmans, Tobi *et al.*, 2008; Tobi, Goeman *et al.*, 2014) e modelos animais (Burdge, Slater-Jefferies *et al.*, 2007) a partir dos quais pôde-se constatar que as adaptações fetais sofridas frente à escassez calórica durante a desnutrição resultaram em mudanças duradouras que modulam o organismos de modo a acumular mais reservas energéticas, culminando com maior risco para a obesidade e doenças associadas (Ryznar, Phibbs *et al.*, 2021)

A gravidez, a fase de lactação e os primeiros anos de vida representam momentos críticos para implementar intervenções importantes. No entanto, não podemos subestimar a importância de promover comportamentos que influenciem tanto fatores nutricionais quanto não nutricionais na adolescência, tanto para homens quanto para mulheres, aproveitando ao máximo o potencial da DOHaD. A juventude, é, portanto, uma fase vital para a implementação de estratégias informadas pela DOHaD (Bay, Morton *et al.*, 2016). Tais evidências corroboram a ideia de que estratégias de prevenção aos distúrbios do metabolismo energético associados a alteração nutricional, podem ser direcionadas para a prole durante as fases críticas do desenvolvimento, incluindo não só a gestação e lactação, mas também o período pré-concepcional (Ramírez-López, Berrios *et al.*, 2015) e a adolescência (De Oliveira, Lisboa *et al.*, 2013; De Oliveira, De Moura *et al.*, 2018; Dos Santos, Miranda *et al.*, 2023).

Dessa forma, os estudos em modelos animais são usados como base para o desenvolvimento de abordagens metodológicas para investigar a variedade de mecanismos potenciais que estão na base do paradigma DOHaD (Segovia, Vickers *et al.*, 2014). Por exemplo, recentemente, foi demonstrado que ratos filhos de mães expostas a uma dieta rica em lipídios durante a gestação e lactação desenvolveram obesidade e resistência hipotalâmica à leptina (Gomes, Bueno *et al.*, 2018).

1.3. Obesidade

A obesidade é uma condição que desempenha um papel significativo no desenvolvimento de diversos problemas de saúde. Ela resulta da complexa interação entre

fatores genéticos, nutricionais e metabólicos. Deve ser classificada com base na composição e distribuição da gordura corporal, uma vez que o tecido adiposo influencia o metabolismo de lipídios e glicose, além de estar associado a um estado de inflamação de baixo grau (De Lorenzo, Soldati *et al.*, 2016).

Até alguns poucos anos, o tecido adiposo branco (TAB) era considerado simplesmente um local de armazenamento passivo de energia. Contudo, atualmente, reconhece-se sua importância como um órgão endócrino crucial para a manutenção da homeostase metabólica, o qual é composto por outros tipos de células, que não somente os adipócitos (que compõem o tipo celular predominante), bem como por uma fração vascular estromal, que engloba pré-adipócitos, fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico. Como órgão endócrino, o tecido adiposo secreta diversos fatores bioativos, agrupados sob o termo geral adipocinas, que desempenham funções fisiológicas fundamentais, incluindo regulação da diferenciação de adipócitos, metabolismo de glicose e lipídios, controle da saciedade, modulação do sistema imunológico, influência na função cardiovascular e regulação neuroendócrina (Segovia, Vickers *et al.*, 2014). Quando sob regulação anormal, as adipocinas contribuem para o desenvolvimento de comorbidades relacionadas à obesidade, tais como dislipidemia, diabetes *mellitus* tipo 2 e doenças cardiovasculares (Wanderley e Ferreira, 2010).

A ocorrência da obesidade tem mostrado um aumento contínuo tanto em nações desenvolvidas quanto em países em desenvolvimento ao longo das últimas quatro décadas. Assim, a obesidade e as condições médicas relacionadas tais como a resistência à insulina representam uma grande preocupação no que diz respeito à saúde pública mundial e aos custos associados à assistência médica (Segovia, Vickers *et al.*, 2014).

Tecidos que são sensíveis à insulina, como o tecido adiposo, o músculo esquelético e o fígado, acabam sofrendo profundas influências da obesidade, tanto em termos de alterações biomoleculares quanto de funcionalidade. Parcialmente, a modulação da sensibilidade à insulina parece estar relacionada a alterações no equilíbrio redox e estresse oxidativo, bem como a fatores de inflamação, nutrientes e substâncias associadas à microbiota intestinal (Barazzoni, Gortan Cappellari *et al.*, 2018).

Com a obesidade, os adipócitos aumentam em tamanho, resultando na perda de sua adequada funcionalidade. Essas células adiposas disfuncionais começam a atrair macrófagos, os quais adquirem um perfil inflamatório; em adição há também aumento na liberação de ácidos graxos livres, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) e citocinas pró-inflamatórias, que se espalham pelo corpo (Ahmed, Sultana *et al.*, 2021).

Os ácidos graxos livres em excesso e os lipídios da dieta acabam se acumulando em órgãos não adiposos, como o fígado, músculo esquelético e pâncreas, formando depósitos de gordura ectópica, levando a um estado de lipotoxicidade, afetando negativamente as organelas celulares, contribuindo para uma liberação excessiva de EROs e substâncias pró-inflamatórias, resultando em inflamação sistêmica de baixo grau, a qual em longo prazo impede que a insulina atue adequadamente na sua via de sinalização interrompendo a homeostase da glicose (Ahmed, Sultana *et al.*, 2021).

1.4. Ação da insulina na manutenção da homeostase glicêmica

O pâncreas desempenha funções essenciais na regulação da digestão de macronutrientes e homeostase glicêmica, consequentemente contribuindo para o equilíbrio do metabolismo energético do organismo, por meio da liberação de diversas enzimas digestivas e hormônios. No que tange a função endócrina, esse conhece cinco tipos de células que secretam uma variedade de hormônios no sistema endócrino (células α , responsáveis pela produção e secreção do glucagon, células β , que produzem e secretam amilina, peptídeo C e insulina, células γ , responsáveis pela produção e secreção do polipeptídeo pancreático (PP), células δ , produtoras de somatostatina e as células ϵ , que secretam grelina), enquanto a somatostatina inibe a liberação de glucagon e insulina, o PP regula a atividade de secreção exócrina e endócrina do pâncreas, possibilitando assim a regulação da homeostase da glicose (Röder, Wu *et al.*, 2016).

A ação da insulina inicia-se com a ligação à sua proteína receptor, o receptor de insulina (IR), presente na superfície celular. O substrato do receptor de insulina (IRS) se liga ao IR fosforilado, desencadeando a ativação de proteínas quinases, incluindo a fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K). A PI3K converte fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) na membrana celular. A acumulação de PIP3 ativa a proteína quinase Akt (PKB), que é fosforilada e ativada. Um dos principais efeitos da ativação da Akt é a translocação do transportador de glicose tipo 4 (GLUT4) para a membrana celular em tecidos como músculo e tecido adiposo branco. Isso facilita a entrada de glicose nas células, onde, no tecido adiposo, a glicose é utilizada na síntese de triglicerídeos, enquanto no músculo é empregada como fonte de energia durante a contração muscular (Gardner e Shoback, 2013).

A ação da insulina é complexa e envolve vários processos no organismo, sendo essencial para a regulação do metabolismo da glicose, é crucial para manter a glicose sanguínea em níveis adequados, permitindo que as células obtenham a energia de que

precisam. Todas as ações da insulina são mediadas pelo seu receptor de membrana (IR), o qual tem caráter tirosina quinase. Ela desempenha um papel central na fisiopatologia da síndrome metabólica, resultando na diminuição da capacidade de resposta à insulina em diversos tecidos, incluindo gordura, fígado e músculos. Vários estudos evidenciaram que a resistência à insulina representa um estágio inicial no desenvolvimento do diabetes *mellitus* tipo 2 (Saltiel, 2021).

1.5. Metformina e seu papel na manutenção da homeostase energética

Agente anti-hiperglicêmico oral amplamente utilizado no tratamento do diabetes *mellitus* tipo 2, a metformina (1,1-dimetilbiguanida) é um medicamento originário da planta arbustiva *Galega officinalis* (também conhecida como galega, lilás francês ou arruda caprária) pertencente a subfamília Faboideae, encontrada no sul da Europa e na Ásia Ocidental, a qual já vem sendo usada na medicina popular há séculos (Bailey, 2017). Graças a seu efeito antidiabético associado, principalmente à inibição da gliconeogênese hepática, bem como graças às raras causas de hipoglicemia em seus usuários, devido ao seu notável perfil de segurança (DeFronzo e Goodman, 1995; King, Peacock *et al.*, 1999), a metformina se tornou o medicamento mais amplamente prescrito para pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2, em todo o mundo, sendo inclusive adicionada à lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial de Saúde em 2011 (WHO, 2011).

Além da eficácia antidiabética, o uso de metformina está associado também à perda de peso, tanto em pessoas diabéticas como não diabéticas (Ouyang, Isnard *et al.*, 2020). A metformina atua por meio de mecanismos que podem ser tanto dependentes quanto independentes da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), exercendo sua influência no organismo não apenas por meio da supressão da atividade mitocondrial respiratória, mas também através da inibição da glicerofosfato desidrogenase mitocondrial e de um mecanismo que envolve o lisossomo (Lamoia e Shulman, 2021).

Nos últimos 10 anos, a compreensão sobre o mecanismo de ação da metformina se desenvolveu significativamente, passando de uma visão simples de que esse medicamento melhora a regulação da glicose no fígado por meio da ativação da AMPK, para uma visão muito mais complexa, que reflete seus diversos modos de ação (Rena, Hardie *et al.*, 2017).

Novas evidências indicam que a metformina tem potencial de melhorar a inflamação sistêmica associada à obesidade, influenciando tanto diretamente quanto indiretamente as células imunes residentes nos órgãos metabólicos, como o tecido

adiposo, o trato gastrointestinal e o fígado. Sendo que o trato gastrointestinal desempenha um papel fundamental na ação desse medicamento, incluindo a regulação do hormônio peptídeo semelhante ao glucagon 1 (GLP-1) e modificações na composição da microbiota intestinal (Foretz, Guigas *et al.*, 2019).

Resultados demonstrados em pesquisas recentes apontam também que o fator de crescimento e diferenciação 15 (GDF-15) tem um impacto significativo na modificação do peso corporal em indivíduos que utilizam a metformina, atuando de forma independente nesse contexto, onde a expressão desencadeada foi claramente identificada em células epiteliais intestinais e renais. Sendo demonstrado que a metformina e outras biguanidas, como a fenformina, induzem a expressão de GDF-15 em hepatócitos animais e humanos (Ouyang, Isnard *et al.*, 2020).

Ratos pré-diabéticos induzidos precocemente pelo tratamento neonatal com L-glutamato monossódico (MSG), quando tratados com metformina apresentaram melhora significativa da intolerância à glicose, resistência tecidual à insulina, hiperinsulinemia e diminuiu o acúmulo de tecido adiposo. Além disso, em outro estudo, ratos adultos que foram inoculados com células de carcinoma de Walker 256 e posteriormente tratados com metformina durante a adolescência apresentaram inibição do crescimento tumoral, indicando que o bloqueio do desenvolvimento do câncer na vida adulta pode ser dependente de uma intervenção precoce (Franco, Miranda *et al.*, 2014).

Diante de tais evidências, nossa hipótese é que um tratamento com metformina, mesmo se feito apenas durante a adolescência, tem potencial de mitigar os efeitos de programação metabólica instalada durante a vida perinatal, via leite materno em uma condição de obesidade, uma vez que estas são fases críticas do desenvolvimento onde a prole jovem (recém-nascida e/ou adolescente) está em uma janela de maior plasticidade neuroendócrina, sendo portanto suscetível a sofrer modulações que podem tanto induzir a uma condição de doença quanto de saúde. Assim, o desenvolvimento de estudos nesse âmbito é de grande relevância para ampliar o conhecimento sobre novas possibilidades terapêuticas acerca da ação de intervenções precoce que possam atenuar o alarmante crescimento de doenças metabólicas no mundo, o que certamente poderá promover melhor qualidade de vida a pessoas acometidas pela síndrome metabólica como também qualidade na destinação de recursos econômicos voltados à saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico da metformina, durante a adolescência, como desprogramador de disfunções metabólicas induzidas pela obesidade materna durante a lactação, bem como analisar seu efeito sexo-dependente.

2.2. Objetivos específicos

Estudo em ratas mães:

- ✓ Avaliar a evolução ponderal, ingestão alimentar e hídrica, bem como a composição corporal materna;
- ✓ Avaliar o valor energético e composição bioquímica do leite materno;
- ✓ Avaliar a homeostase glicêmica e perfil lipídico materno durante o período de aleitamento da prole.

Estudo em ratos machos e fêmeas (prole):

- ✓ Avaliar a composição corporal e comportamento alimentar;
- ✓ Avaliar a homeostase glicêmica e perfil lipídico;
- ✓ Avaliar a sensibilidade à insulina;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Condições éticas e ambientação animal

Foram utilizados ratos Wistar, criados no biotério do Núcleo de Pesquisa e Apoio Didático em Saúde (NUPADS), Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), *Campus* Universitário de Sinop. Todos os procedimentos experimentais foram desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Mato Grosso; segundo os princípios éticos na experimentação animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle na Experimentação Animal (CONCEA) em consonância com a Lei 11.794/2008. Os protocolos foram aprovados pelo comitê de ética animal (protocolo: 23108.017073/2019-56).

Ao longo do período experimental, os animais ficaram no biotério sob condições controladas de temperatura, em ciclo claro-escuro de 12 horas e umidade relativa do ar em $60 \pm 5\%$, com água e ração *ad libitum*.

O acasalamento foi realizado na proporção de duas fêmeas para um macho, com idade média de 60 dias e após regulação de ciclo estral. Assim que identificada a gestação, as ratas prenhas foram alojadas em gaiolas padrão com apenas um animal por caixa e com livre acesso a água e comida durante o período da gestação.

3.2. Modelo experimental

Ao nascimento, o tamanho da ninhada foi padronizado para oito filhotes, quatro machos e quatro fêmeas para cada mãe. As ninhadas foram divididas randomicamente em dois grupos, grupo controle (Cont), cujas ratas mães foram alimentadas com dieta padrão para roedores durante toda a lactação (Nuvilab CR-1, Nuvital®, Curitiba, PR, Brasil) e grupo obeso (Ob), cujas ratas mães foram alimentadas durante a lactação com uma dieta obesogênica hipercalórica de alta palatabilidade, contendo 729 kcal mais calórica que a ração padrão. Os valores de macro e micronutrientes estão apresentados na Tabela 1. Os *pellets* foram produzidos no laboratório a partir da mistura composta por ração padrão, caseína, óleo de soja, leite condensado, banha de porco, amido de milho, açúcar cristal e adição de mistura de vitaminas e sais minerais específicos para manter os valores de adequados de micronutrientes, segundo a recomendação do *American Institute of Nutrition*.

Tabela 1. Composição da dieta

Componentes	Dieta padrão	Dieta hipercalórica
	(g/kg)	(g/kg)
Carboidratos	655,00	586,35
Proteínas	220,00	163,20
Lipídeos	40,00	176,71
Fibras	40,00	28,74
Mistura de vitaminas*	10,00	10,00
Mistura de minerais*	35,00	35,00
Total (g)	1.000,00	1.000,00
Valor calórico (Kcal)	3.860,00	4.589,00

Os valores estão apresentados em g/1.000 g de dieta.

* A Mistura de sais minerais e de vitaminas usadas na composição da dieta seguiram as recomendações do American Institute of Nutrition (Reeves, Nielsen *et al.*, 1993).

Ratas do grupo Obese ingeriram além de água pura, água com adição de sacarose à 10% e seguiram nessas condições por todo o período de amamentação de sua prole, de 22 dias.

Durante todo o período de lactação, as ratas de ambos os grupos experimentais foram pesadas, bem como tiveram sua ingestão alimentar e hídrica aferidas a cada dois dias.

3.3. Coleta e análise de leite materno

Ao 12º dia de amamentação, para padronizar um tempo mínimo de jejum na prole e assegurar produção e acúmulo de leite nas mães, as ratas lactentes foram separadas de seus filhotes por um período de 2h (das 08h às 10h), logo após esse período as ratas foram anestesiadas (ketamina, 75 mg + xilazina, 15 mg/kg de peso corporal, i.m.) e submetidas a uma injeção de ocitocina sintética (2,5 IU/kg de peso corporal, i.p.;

Oxytocin[®], Chemical Union, Embu, São Paulo, SP, Brasil) para subsequente coleta de leite (Parrela, Borkenhagen *et al.*, 2022).

Com auxílio de pipeta plástica Pasteur[®], as ratas foram ordenhadas manualmente e o leite (500µL) coletado em tubo plástico Eppendorf[®] acomodado sobre placa de gelo durante todo o período da coleta congelados em ultra freezer -80 °C (Parrela, Borkenhagen *et al.*, 2022) para posterior dosagens bioquímicas (glicose, triglicerídeos, colesterol total, cálcio e proteínas totais) por espectrofotometria, utilizando-se de kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica[®], Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil)

3.4. Crematócrito do leite

O crematócrito consiste na técnica analítica que permite a estimativa do conteúdo energético do leite (Lucas, Gibbs *et al.*, 1978). Para cada amostra de leite, utilizou-se três alíquotas de 75µL coletadas em tubos micro capilares (75mm x 1mm x 1,5mm) com uma das extremidades vedada. Após micro centrifugação por 15 minutos, sob agitação de 995 g e refrigeração à 4°C (SOLAB refrigerada SL 703) duas colunas foram formadas, a coluna de creme e a coluna de soro, as quais foram medidas com auxílio de régua específica e os dados expressos em milímetros. Os cálculos foram realizados, a partir das medidas das colunas, estimando-se o valor calórico e a porcentagem de gordura do leite e comparando-os com seus controles, baseados em uma equação de regressão, usando-se fatores de conversão de kcal/g de lipídeos, carboidratos e proteínas (Wang, Chu *et al.*, 1999) e seguindo recomendação de protocolo de banco de leite humano, como já bem demonstrado (Lucas, Gibbs *et al.*, 1978; Xavier, Scomparin *et al.*, 2019):

1. Avaliação do teor de creme: $\text{Coluna de creme (mm)} \times 100 \div \text{coluna total (mm)} = \% \text{ de creme.}$

2. Avaliação do teor de gordura: $(\% \text{ de creme} - 0,59) \div 1,46 = \% \text{ de gordura.}$

3. Cálculo do conteúdo energético total: $(\% \text{ de creme} \times 66,8 + 290) = \text{kcal/litro.}$

Coluna total = coluna de creme + coluna de soro
Coluna de creme = componentes lipossolúveis + conteúdo proteico

3.5. Avaliação do efeito da dieta hipercalórica sobre composição corporal materna

Ao término do período de amamentação da prole, as ratas mães foram pesadas e submetidas a jejum noturno de 12h, e posteriormente foram eutanasiadas por decapitação (Parrela, Borkenhagen *et al.*, 2022) para coleta de amostra teciduais e sangue total. Em seguida o sangue foi centrifugado (SOLAB refrigerada SL 703) e o plasma separado e

armazenados em freezer à -20 °C para posterior dosagens bioquímicas dos níveis de glicose e perfil lipídico por meio da utilização de kits comerciais (Gold Analisa Diagnóstica®, Ltda., Belo Horizonte, MG, Brasil) por espectrofotômetro (BEL Photonics).

Para a remoção das amostras teciduais as ratas foram laparatomizadas e então dissecou-se o tecido adiposo marrom (TAM), gordura visceral (periovariana, retroperitoneal e mesentérica), amostras de músculo esquelético (extensor longo dos dedos, EDL e sóleo) e o fígado, os quais foram pesados em balança analítica (Marte Científica modelo AD500) e armazenados em ultra freezer à -80 °C.

3.6. Avaliação do estresse oxidativo

A análise do estado redox foi realizada por meio da mensuração dos marcadores de defesa antioxidante (como a atividade das enzimas CAT e GST e dos marcadores GSH) e dos marcadores de danos oxidativos [como a peroxidação lipídica, através da quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e carbonilação de proteínas (Carbonil)]. As análises foram realizadas no Laboratório Integrado de Pesquisas Químicas (LiPEQ), sob a supervisão da Prof.^a Dr. Valéria Sinhorin, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) Campus Universitário de Sinop.

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

3.6.1 Quantificação da atividade da CAT

A atividade enzimática da CAT foi determinada de acordo com metodologia já bem estabelecida (Nelson e Kiesow, 1972). Amostras teciduais de fígado foram homogeneizadas na proporção 1:30 e 1:10 em solução resfriada de tampão fosfato (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 7,4, com Triton X-100 e cloreto de sódio (NaCl) com auxílio de um homogeneizador dispersor. Em seguida as amostras foram centrifugadas à 10.000 rpm à 4 °C por 15 minutos. A atividade da CAT foi quantificada em espectrofotômetro (comprimento de onda de 240 nm), a qual se deu através da mensuração da velocidade com que o H_2O_2 foi reduzido à H_2O . Para a realização da leitura da atividade da CAT foram preparados tampão fosfato 50 mmol/L, pH 7,0, e H_2O_2 300 mmol/L. O resultado foi expresso como $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína.

3.6.2 Quantificação da atividade da GST

Amostra tecidual de fígado foi diluída na proporção de 1:10. Em seguida, foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 7,0 e centrifugadas à 10.000 rpm à 4 °C por 15 minutos. Para leitura, foram preparadas soluções 27 de tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 6,0, GSH 10 mmol/L e 1-cloro-2,4- dinitrobenzeno (CDNB) 20 mmol/L. Durante a leitura foi utilizado 1,250 mL de tampão com pH 6,0, mais 150 µL de GSH, 25 µL de tecido e 75 µL de CDNB. O resultado foi expresso como µmol GS-DNB/min/mg proteína (Habig, Pabst *et al.*, 1974).

3.6.3 Quantificação do TBARS

As TBARS foram quantificadas conforme método descrito por (Buege e Aust, 1978). A amostra tecidual de fígado foi homogeneizado em tampão fosfato de potássio (K_2HPO_4) 20 mmol/L, pH 7,5, e centrifugados a 4.000 rpm, por 15 minutos à 4°C. A seguir foram adicionados 500 µL de TCA a 10%, e 500 µL de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67%. A mistura foi aquecida em água fervente por 30 minutos e resfriada em banho de gelo por 10 minutos. As amostras foram agitadas vigorosamente em vórtex. Após centrifugação a 10.000 rpm, por 15 min à 4°C, as TBARS foram determinadas na absorbância de 535 nm, utilizando-se a curva de malonaldeído (MDA) como padrão. O resultado foi expresso como nmol/MDA/mg proteína.

3.6.4 Quantificação dos níveis de carbonilação de proteínas

A quantificação dos níveis de carbonilação de proteínas foi realizada usando método descrito por (Colombo, Clerici *et al.*, 2016). O fígado foi homogeneizado com 1 mL de tampão fosfato-salino (PBS), e posteriormente centrifugados a 3000 rpm por 10 minuto a 4 °C. Em placa de 96 poços, foram 28 colocados 100 µL e, em seguida, adicionados 100 µL de solução de DNPH (19,8 mg de DNPH em 10 mL de HCl 2 mol/L). A placa foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente no escuro e, em seguida, 50 mL de NaOH 6 mols/L (24 g de NaOH em 100 mL de H₂O) foram adicionados. A leitura foi realizada a 450 nm e o resultado expresso em nmol/carbonil/mg proteína.

3.7. Avaliação da ingestão de leite e evolução ponderal da prole durante a lactação

A evolução ponderal da prole foi aferida a cada dois dias, desde o nascimento até os 22 dias de vida, quando se deu o desmame.

Para quantificação da ingestão de leite a prole foi pesada e então separada de sua respectiva mãe pelo período de 4h (das 10h às 14h) para assegurar jejum de 4h (Parrela,

Borkenhagen *et al.*, 2022). A ingestão de leite foi aferida nas idades 6, 11 e 16 dias de vida da prole.

3.8. Tratamento da prole com metformina na adolescência

Aos 22 dias de vida, a prole foi desmamada e dividida por sexo (machos e fêmeas) em caixas separadas, as quais, aos 30 dias de vida, foram subdivididas em grupo Cont, composto pela prole (machos e fêmeas) cuja mãe ingeriu dieta padrão durante lactação e não receberam tratamento medicamentoso durante adolescência; grupo controle-metformina (Cont-Met), composto pela prole (machos e fêmeas) cuja mãe ingeriu dieta padrão durante lactação e foram tratados com metformina durante adolescência (250 mg/kg em água de beber, dos 30 aos 60 dias de vida); grupo Ob, composto pela prole proveniente de mães submetidas a ração hipercalórica na lactação e que não receberam tratamento medicamentoso durante a adolescência; e grupo Ob metformina (Ob-Met), composto pela prole oriunda de mães que ingeriram dieta obesogênica durante lactação e que foram tratados com metformina durante a adolescência (250 mg/kg em água de beber, dos 30 aos 60 dias de vida).

A metformina (Metformin cloridrato, Medley, Brasil) foi dissolvido em água na dose de 250 mg/kg de peso corporal, a qual foi adaptada de estudos prévios (Li, Zhang *et al.*, 2020; Xavier, 2022), fornecidas no reservatório de água da caixa dos ratos no período da adolescência, dos 30 aos 60 dias de idade, enquanto os outros grupos receberão água pura.

3.9 Avaliação da homeostase glicêmica da prole

Entre os 110 e os 115 dias de vida, um lote de ratos de cada sexo e grupo experimental foi pesado e submetido aos testes de tolerância intraperitoneal à glicose (ipGTT), o qual foi realizado após jejum de 12 horas (das 7h às 19h) em ratos conscientes, sem efeito de anestesia. Para o ipGTT, administrou-se uma carga de glicose (2g/kg de peso corporal, i.p.), anteriormente a administração de glicose foi realizada a primeira dosagem da glicemia de jejum, que correspondeu ao tempo zero (0 minutos) em seguida a dose de glicose foi aplicada em cada rato, e então foram feitas novas dosagens de glicose sanguínea aos 30, 60, 90 e 120 minutos após aplicação (De Freitas Mathias, Miranda *et al.*, 2020)

Após 48h da realização do ipGTT, os mesmos ratos foram submetidos ao teste intraperitoneal de tolerância à insulina (ipITT), o qual foi realizado após jejum de 4h,

onde foi administrada uma dose de insulina (1 IU/kg de peso corporal, i.p.), e como anteriormente mencionado, antes da administração de insulina uma primeira dosagem de glicemia foi obtida, correspondendo ao tempo zero (0 minutos) e então após a administração da insulina, nos tempos 15, 30, 45 e 60 min foram feitas novas dosagens de glicose sanguínea. Ambos os testes foram realizados com glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche) e a amostra de sangue foram provenientes da veia caudal (De Freitas Mathias, Miranda *et al.*, 2020).

3.10 Avaliação da composição corporal

Aos 120 dias de vida, após jejum noturno de 12h (das 20h às 08h) os ratos foram pesados e em seguida eutanasiados por decapitação sem efeito de anestésico, para a coleta de amostras sanguíneas, as quais foram coletadas em tubos heparinizados e centrifugadas por 15 minutos a 1248 g (SOLAB refrigerada SL 703). Em seguida o plasma foi coletado e refrigerado a -20°C para posterior dosagens (Parrela, 2022).

Aferiu-se o comprimento naso anal (CNA) (Bernardis e Patterson, 1968), e na sequência após laparotomia, amostras teciduais foram dissecadas, como o tecido adiposo branco visceral (gordura periepídimal ou periovariana, retroperitoneal e mesentérica), músculo esquelético (EDL e músculo sóleo), TAM, pâncreas e fígado, que foram pesados individualmente em balança analítica (Marte Científica modelo AD500) e em seguida foram armazenados em ultra freezer à -80°C para avaliação posterior.

3.11 Análises estatísticas

Os dados foram primeiramente submetidos ao teste de normalidade para avaliação da distribuição Gaussiana, assumindo uma distribuição Gaussiana, os dados que continham dois grupos foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student, e os demais foram submetidos a análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA), seguido dos pós teste de Tukey's, considerando-se valores $P < 0,05$ como estatisticamente significativos.

Todas as avaliações estatísticas foram realizadas através do programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 8.0 (Graphpad Prism 8.0, Software for Windows, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1. Ingestão calórica, hídrica e evolução ponderal materna durante a lactação

Ao considerarmos a ingestão calórica (calorias presentes na dieta hipercalórica e na solução de sacarose à 10%), observou-se que o grupo Obese consumiu 32,92% de calorias a mais em comparação ao Cont ($P < 0,001$, Fig. 1A-B). Quanto à ingestão hídrica não observamos diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 1C-D). Durante a lactação, não se observou diferença estatística na evolução ponderal entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 1E-F).

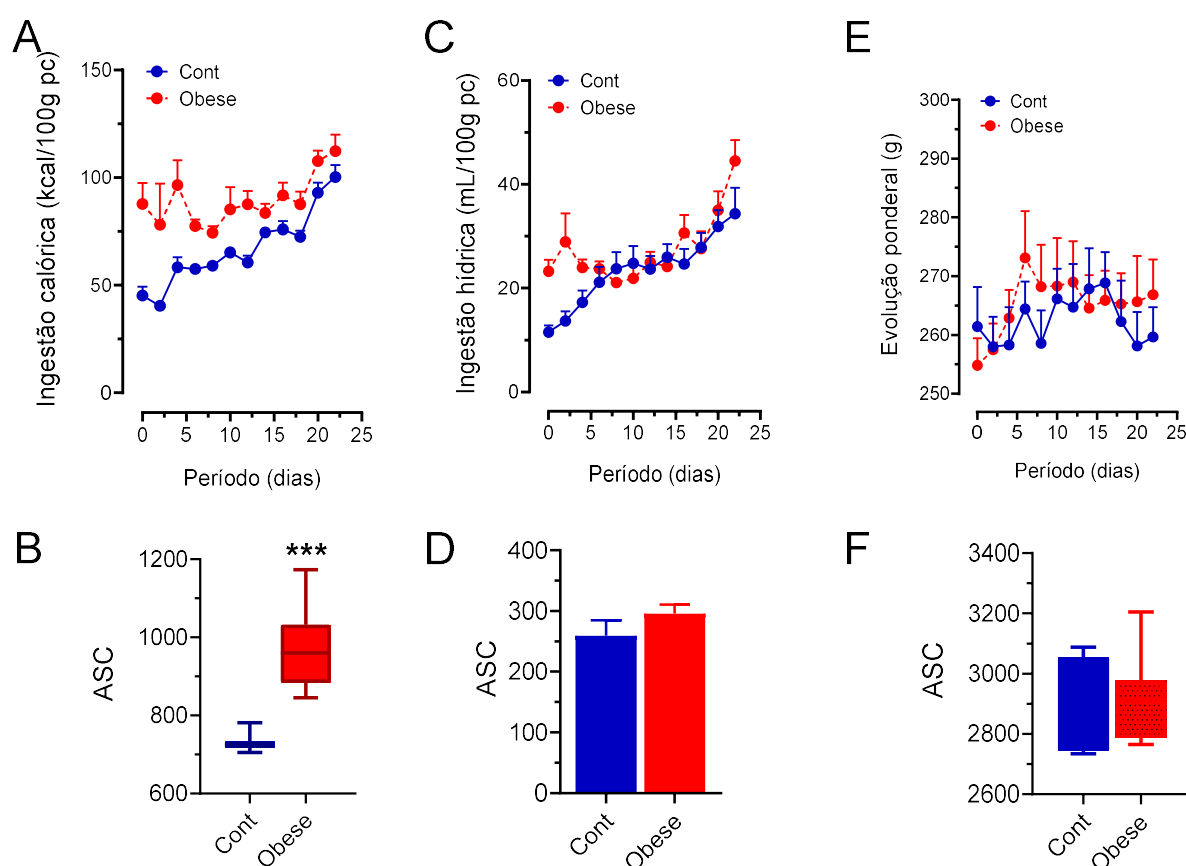


Figura 1. Ingestão de mães durante lactação e evolução ponderal. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 7-9 ratas, os quais foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student, onde *** $P < 0,001$. ASC, representa a área sob a curva da respectiva figura acima.

4.2 Composição corporal materna

No final da lactação, nas mães Obese foram observados valores aumentados de peso corporal em 11,58% em relação ao grupo Cont, ($P < 0,01$, Fig. 2A), já o comprimento naso-anal (CNA) não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 2B).

Quanto à composição corporal, observou-se que o índice de adiposidade das mães Obese apresentou aumento de 105% em relação com as mães Cont ($P<0,001$, Fig. 2C), ao passo que o índice de massa magra e a gordura marrom não apresentaram diferença entre os grupos ($P>0,05$, Fig. 2D-E).

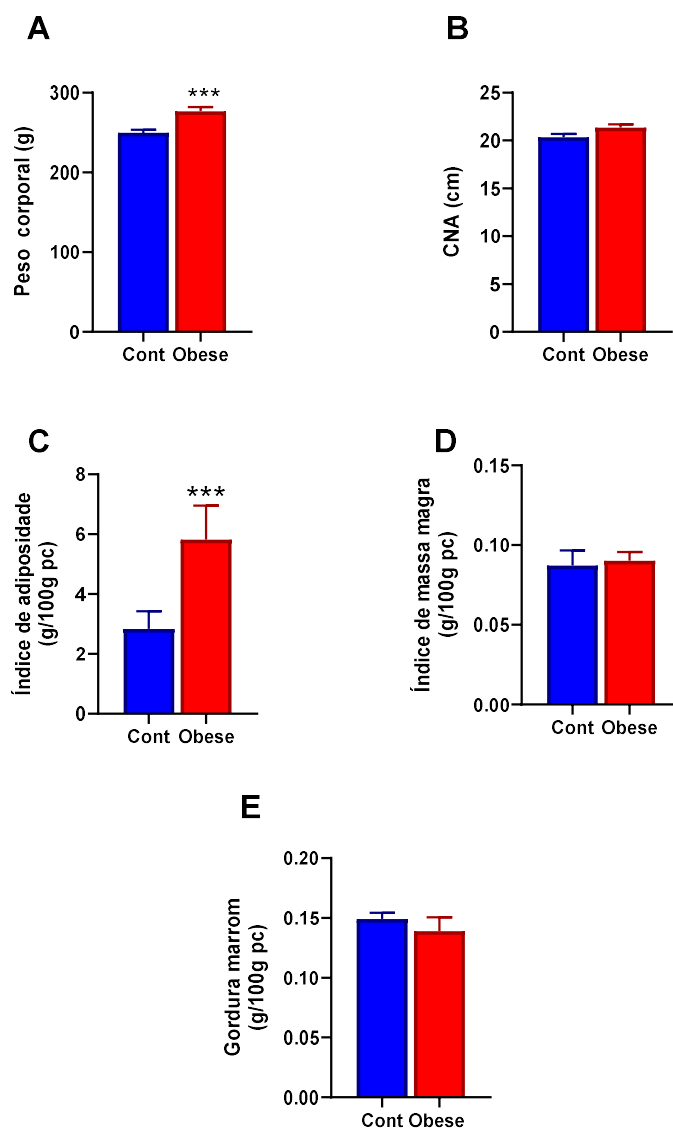


Figura 2. Composição biométrica das mães ao término da lactação. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 7-9 ratas, os quais foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student. Sendo *** $P<0,001$ e ** $P<0,01$. CNA, comprimento naso anal.

4.3 Parâmetros bioquímicos das matrizes

Quanto aos valores observados no plasma materno pós lactação, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais quanto aos valores dos níveis de glicose, colesterol total e colesterol VLDL ($P>0,05$, Fig.3A-C).

Quanto ao perfil lipídico, em comparação às ratas Cont, as ratas Obese apresentaram uma diminuição de 53,75% no colesterol HDL e aumento de 38,4% no triglicerídeo, de 5,79% no índice TyG comparadas as ratas Cont ($P<0,01$, Fig. 3D-G).

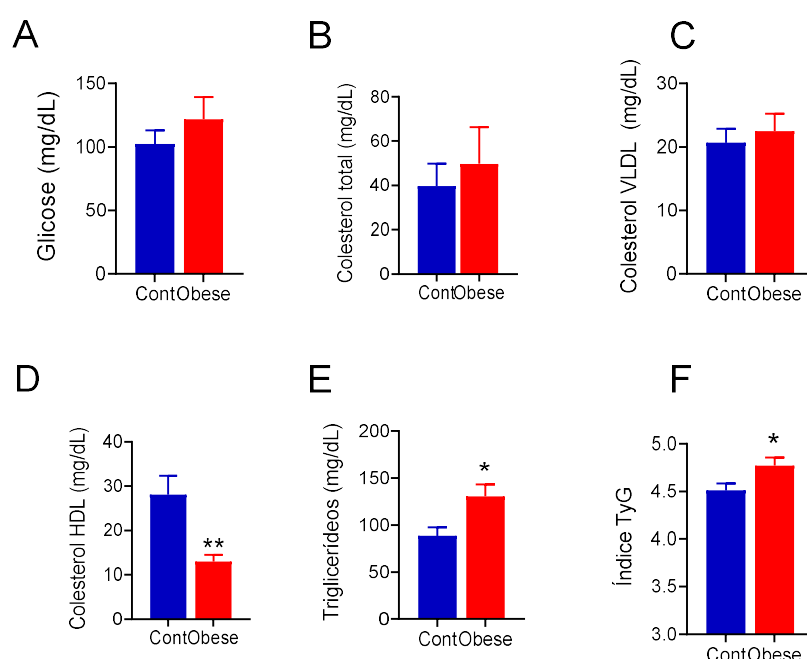


Figura 3. Análise bioquímica plasma materno ao final da lactação. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 6-8 ratos, os quais foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student, * $P<0,05$, ** $P<0,01$. Cont versus Ob.

4.4 Avaliação da função hepática materna

Nesse sentido, quando comparado ao grupo Controle, o peso relativo do fígado aumentou 27,03% ($P<0,01$, Fig.4A), o nível de proteínas plasmáticas totais foi reduzido em 16% ($P<0,05$, Fig.4B) enquanto os níveis plasmáticos enzimáticos de AST aumentaram 38,37% ($P<0,01$, Fig.4C) e ALT em 61,54% ($P<0,05$, Fig.4D). Quanto ao estado redox no fígado, as mães obesas apresentaram níveis aumentados de TBARS, 165,45% maiores do que nas mães do grupo controle ($P<0,01$, Fig. 4A), e carbonil, que foi aumentado em 20,62% em comparação com as mães do grupo controle ($P<0,05$, Fig. 4B). Além disso, a CAT hepática foi 24,25% maior do que nas mães do grupo controle

($P < 0,05$, Fig. 8C). E sem diferenças estatísticas entre os grupos em GST ($P > 0,05$, Fig. 4D)

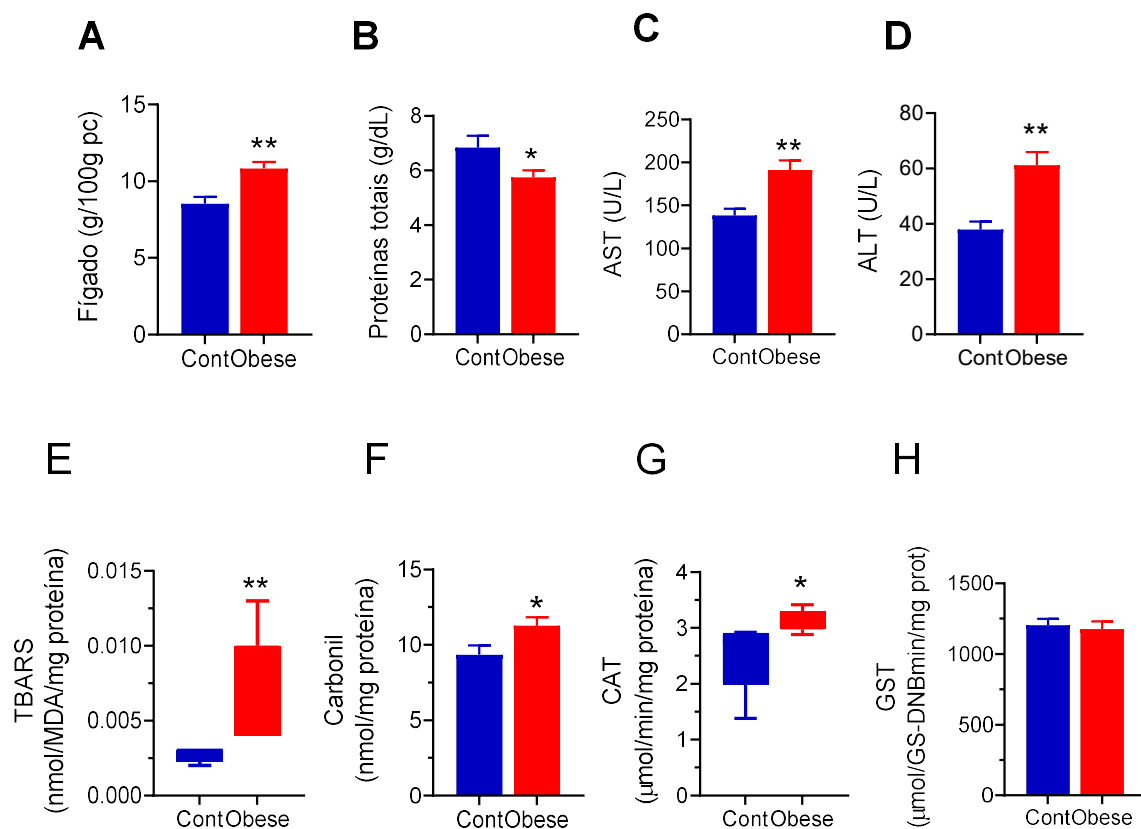


Figura 4. Análise hepática materna ao final da lactação. Os dados estão apresentados como média ± erro padrão da média de 6-8 ratos, os quais foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. Cont *versus* Ob.

4.5 Composição do leite materno

A análise de leite materno apresentou os valores de triglicerídeos de ratas Obese aumentado em 32,17% em relação as Cont ($P < 0,05$, Fig. 5A), enquanto reduziu em 18,14% os níveis de proteína total em Obese ($P < 0,001$, Fig. 5B) e o colesterol total no grupo Obese apresentou-se 23,94% maior em relação ao valores de Cont ($P < 0,05$, Fig. 5C) e apresentou níveis aumentados de glicose em 17,12% ($P < 0,05$, Fig. 5D). Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais quanto aos valores de cálcio ($P > 0,05$, Fig. 5E).

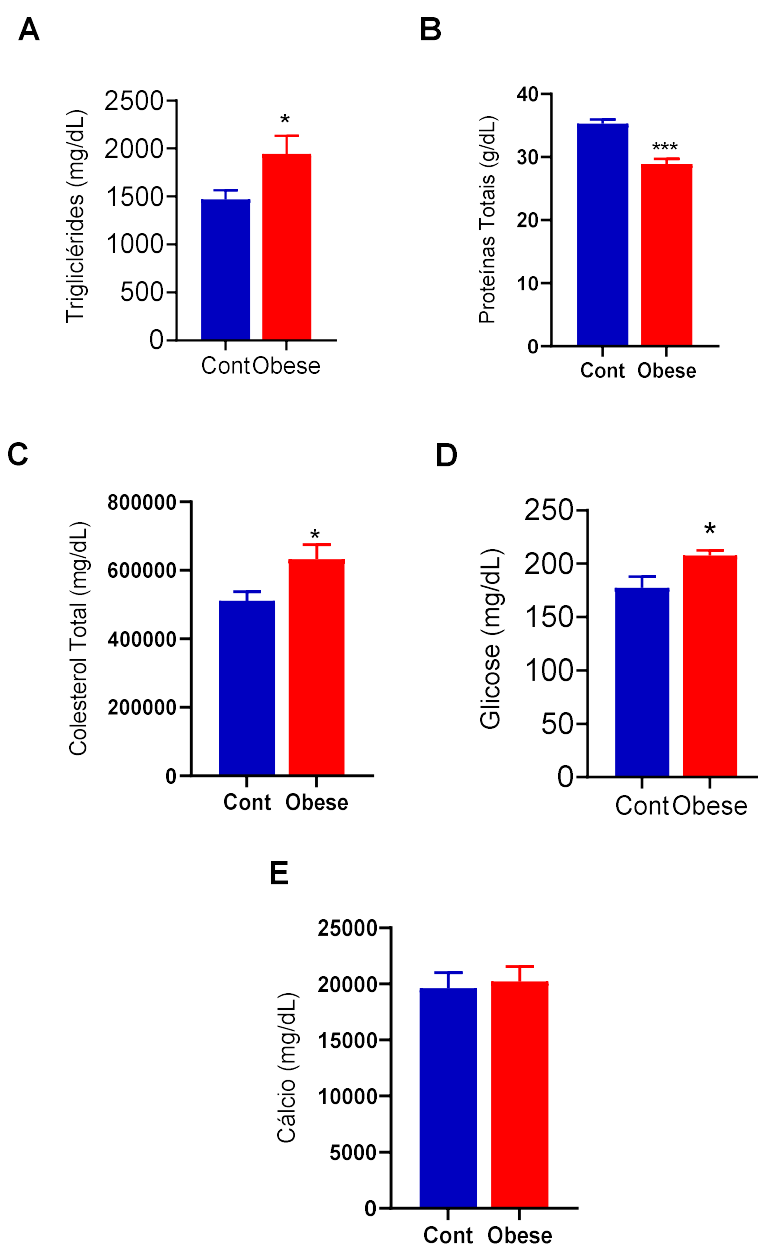


Figura 5. Análise bioquímica do leite. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 6-8 ratos, os quais foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student, * $P < 0,05$ *** $P < 0,01$. Cont versus Ob.

Quanto ao conteúdo de gordura no leite, observou-se aumento de 96,96% no grupo Obese em comparação Cont ($P < 0,001$, Fig. 6A) e aumento de 50,95% no conteúdo energético total do grupo Obese em relação ao grupo Cont ($P < 0,01$, Fig. 6B).

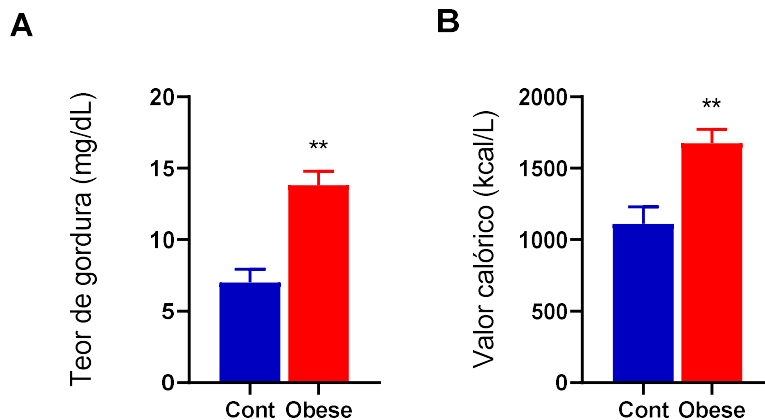


Figura 6. Conteúdo de gordura no leite. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 6-8 ratos, os quais foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student, ** $P < 0,01$. Cont *versus* Ob.

4.6 Avaliação da evolução ponderal e ingestão de leite da prole durante lactação

Como esperado, o peso ao nascer não diferiu entre sexo e nem entre grupo ($P > 0,05$, dados não mostrados). Por outro lado, durante o período da lactação, os filhotes machos de mães do grupo Obese mostraram um ganho de peso de 14,9%, em relação aos filhotes de mães Cont ($P < 0,001$, Fig. 7A), enquanto que as fêmeas não apresentaram diferença significativa no ganho de peso quando em comparação com o grupos do mesmo sexo ($P > 0,05$, Fig. 7B).

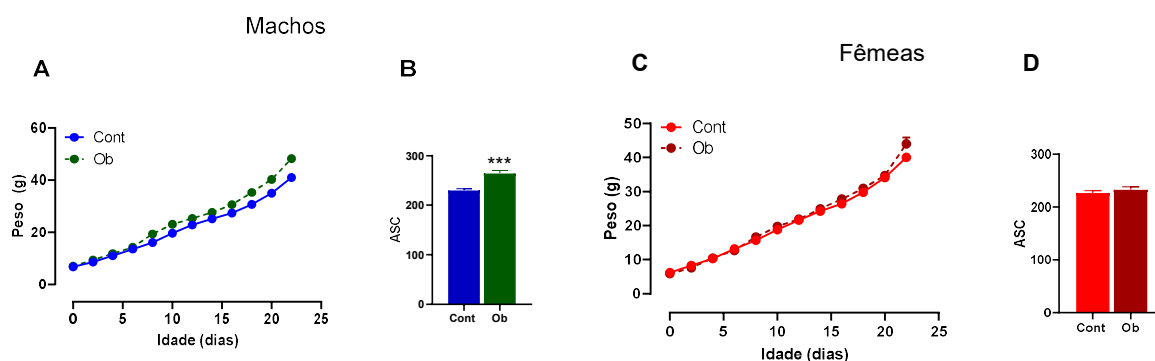


Figura 7. Evolução ponderal da prole durante lactação. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 20-29 ratos, os quais foram submetidos à análise estatística através do teste t de Student, *** $P < 0,001$ Conte *versus* Ob. ASC, área sob a curva da respectiva curva de evolução ponderal ao lado.

Quanto a ingestão de leite, observou-se que os ratos machos filhos de mães Obese apresentaram aumento em 84,2% no 6º dia de vida, em 29,7% no 11º e em 39,4% no 16º dia de vida quando comparados aos ratos de mães Cont ($P < 0,01$, Fig. 8A – C).

No mesmo momento, as fêmeas filhas de mães Obese também mostraram aumento no consumo de leite, sendo observado aumento de 66,1% no 6º dia de vida, de 29,1% no 11º e de 42,7% no 16º, em relação a quantidade relativa de leite ingerido pelas filhas de mães Cont ($P < 0,01$, Fig. 8A-C).

Aos 22 dias de idade os machos Ob, proveniente de mães Obese, tiveram seu peso corporal 14,4% maior em relação aos machos Cont; enquanto as fêmeas Ob apresentaram aumento de 16,4%, em relação as fêmeas Cont ($P < 0,05$, Fig. 8D).

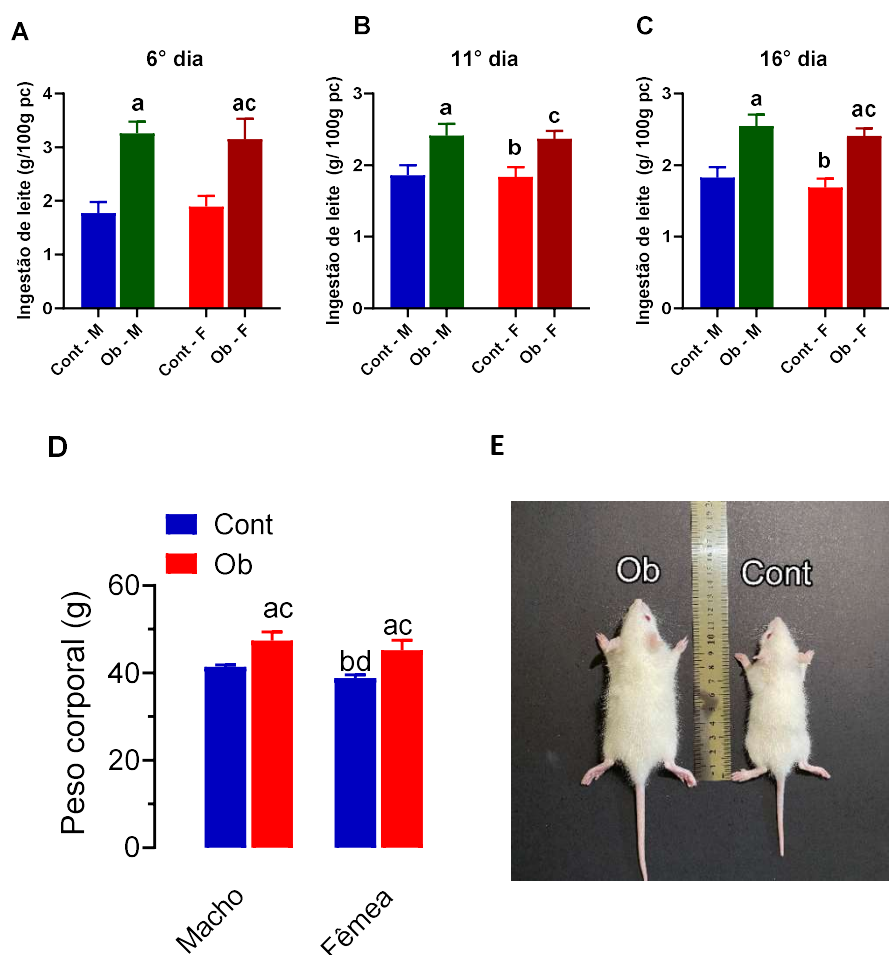


Figura 8. Ingestão de leite e peso corporal ao desmame. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 20 ratos, de ambos os sexos, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde a) Cont macho; b) Ob macho; c) Cont fêmea; d) Ob fêmea. A imagem representada na figura E demonstra a diferença do tamanho (comprimento naso-anal dos ratos macho Ob e macho Cont aos 22 dias).

4.7 Evolução ponderal, ingestão alimentar e consumo hídrico dos animais pós-desmame

Nos machos, no período pré-tratamento (22- 30 dias) apenas o grupo Ob teve diferença em relação ao grupo Cont. Durante o período de tratamento com metformina (30-60 dias), em comparação ao animais Cont machos, o ganho de peso corporal dos ratos Ob foi 10,8% maior; por outro lado os ratos Ob Met apresentaram redução de 10% no peso corporal em relação aos Ob ($P<0,05$, Fig.9 A-C), enquanto o grupo Cont Met não diferiu dos Cont ($P>0,05$, Fig. 9A-C). Já no período pós-tratamento (60-120 dias) quanto ao peso corporal, o grupo Ob manteve seu peso 11,7% maior em relação aos animais Cont, o grupo Ob Met permaneceu 7% menor que os Ob ($P<0,05$, Fig. 9A-C);e ao passo que o grupo Cont met não se diferiu do Cont ($P>0,05$, Fig. 9A-C).

Na análise dos mesmos parâmetros nas fêmeas, antes do tratamento, não se observou nenhuma diferença entre os grupos, durante o tratamento com metformina, observou-se que o grupo Ob se apresentou 2,4% maior em comparação ao Cont ($P<0,05$, Fig. 9D-E) e o grupo Ob Met teve 8,5% de redução no peso corporal em relação aos animais Ob ($P<0,05$, Fig. 9D-E). O grupo Cont Met não apresentou diferença estatística quando comparado ao grupo Cont ($P>0,05$, Fig. 9D-E). No período pós-tratamento, nenhum dos grupos apresentou diferença estatística entre si ($P>0,05$, Fig. 9F).

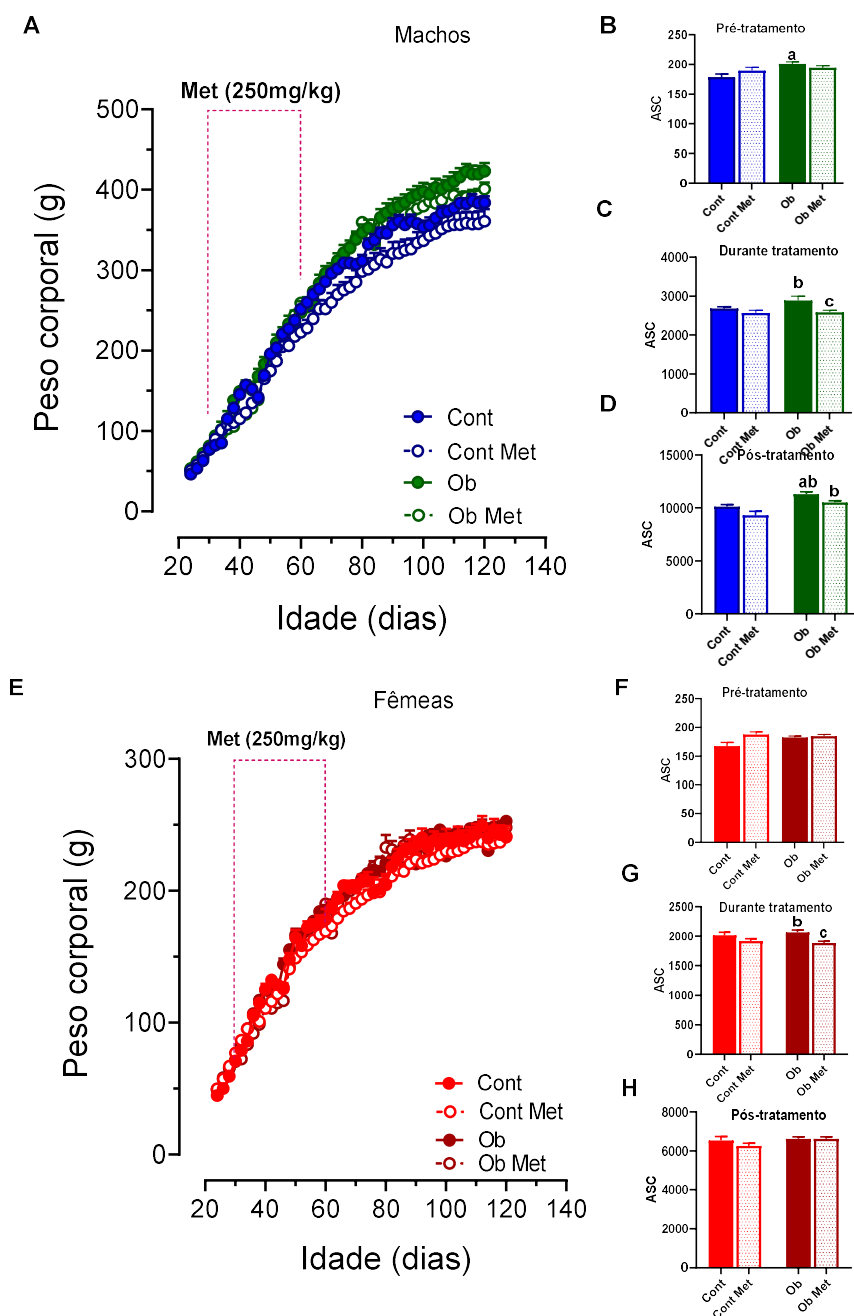


Figura 9. Evolução ponderal da prole machos (A, B, C e D) e fêmeas (E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 10-15 ratos, machos e fêmeas, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde a) Cont; b) Cont Met; c) Ob; d) Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

Em relação ao peso corporal dos ratos machos Cont, em idades específicas, os Ob apresentaram peso corporal aumentado em 8,55% aos 30 dias de vida, em 11,68% aos 60 dias de vida e em 14,40% aos 120 dias de vida ($P < 0,05$, Fig. 10). Já nas fêmeas, não foram

observadas diferenças estatísticas aos 30 dias de vida, já aos 60 dias observamos um aumento de 12,82% no grupo Ob *versus* Cont e aumento de 12,75% em relação ao grupo Cont aos 120 dias de vida ($P < 0,05$, Fig.10)

No final do tratamento, aos 60 dias de vida, no sexo masculino, temos redução de 13,97% entre os grupos Cont *versus* Cont Met e sem diferença entre Ob *versus* Ob-Met; por outro lado, aos 120 dias de vida, o grupo Ob Met apresentou peso corporal 9,13% menor do que o grupo Ob ($P < 0,05$, Fig. 10). Já no sexo feminino, tanto aos 60 quanto aos 120 dias de vida, não foram observadas diferenças estatísticas entre os demais grupos.

Ao se comparar, machos *versus* fêmeas, todos os grupos foram estatisticamente diferentes, tanto aos 60 quanto aos 120 dias de vida, quando comparados ao respectivo grupo de sexo oposto ($P < 0,001$, Fig. 10).

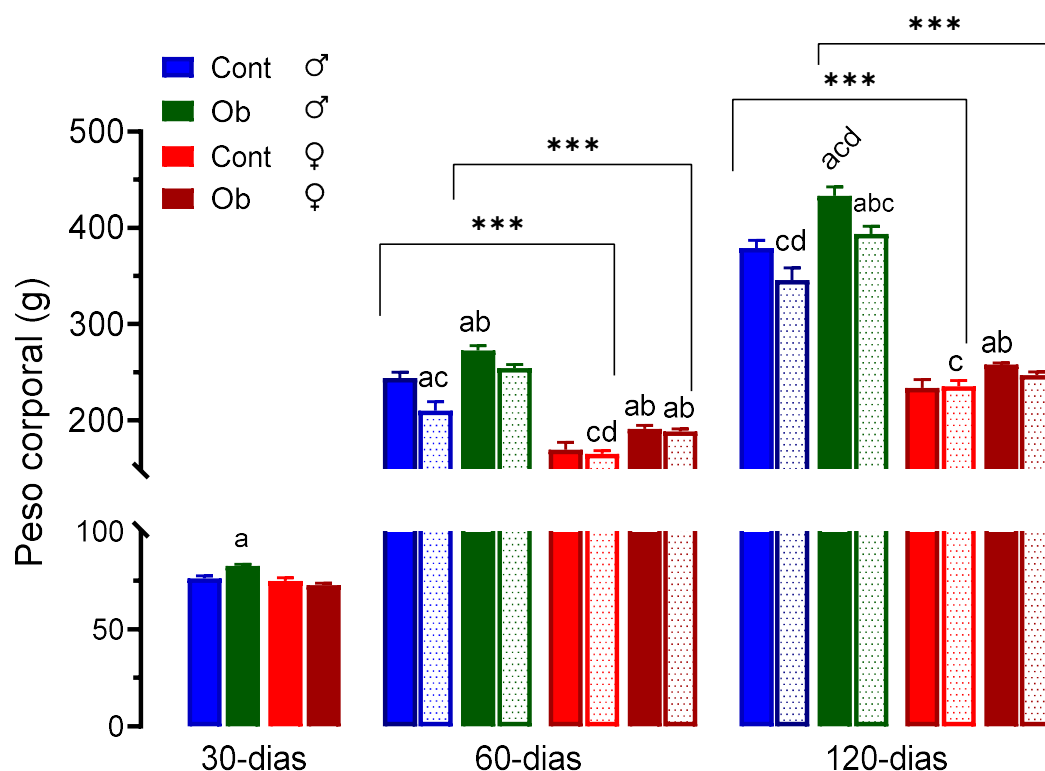


Figura 10. Peso corporal nas idade 30, 60 e 120 dias (A, B e C) de machos e fêmeas. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 2-4 ninhadas, machos e fêmeas, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde a) Cont; b) Cont Met; c) Ob; d) Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

Quanto à ingestão alimentar dos machos, no período pré-tratamento o grupo Ob e o já designado Ob Met apresentaram um consumo 22% maior comparado ao grupo Cont ($P < 0,01$, Fig. 11A-B). Por sua vez, o grupo já designado Cont Met não diferiu do grupo Cont ($P > 0,05$, Fig. 11A e B).

Durante o período do tratamento com metformina, não foram observadas diferenças entre nenhum dos grupos ($P > 0,05$, Fig. 11A e C).

No período pós-tratamento, o grupo Ob consumiu 12,8% a mais que o grupo Cont ($P < 0,05$, Fig. 11A e D). Por outro lado, embora o grupo Ob Met tenha ingerido 6,25% a menos que o Ob, essa redução na ingestão alimentar não diferiu entre eles ($P > 0,05$, Fig. 11A e D), tal como o grupo Cont Met que também não apresentou diferença quando comparado ao grupo Cont ($P > 0,05$, Fig. 11A e D).

Nas fêmeas, antes do tratamento com metformina, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 11E e F). Embora tenha se observado que o grupo Ob consumiu 28,5% mais em relação ao grupo Cont, esse dado não tenha sido estatisticamente diferente ($P > 0,05$, Fig. 11E-F).

Durante o período do tratamento com metformina, o grupo Ob seguiu ingerindo maior quantidade de dieta, apresentando 5,1% de aumento quando comparado ao grupo Cont ($P < 0,05$, Fig. 11E e G). Já o Ob Met ingeriu 10,4% a menos que o Ob e 6% a baixo do Cont ($P < 0,05$, Fig. 11E e G). Da mesma forma, os animais Cont Met mostraram uma redução de 6% na ingestão alimentar quando comparados ao grupo Cont ($P < 0,05$, Fig. 11E e G).

No período pós-tratamento não se observou diferença entre os demais grupos ($P > 0,05$, Fig. 11E e H).

Na avaliação da ingestão hídrica dos ratos machos, antes do período de tratamento com metformina, observamos que o grupo Ob consumiu 37,5% menos água que o grupo Cont ($P < 0,05$, Fig. 12A-B). Não apresentando diferenças entre os demais grupos ($P > 0,05$).

Durante o período de tratamento com metformina, o grupo Ob segue ingerindo menos água, de modo que se observou um consumo hídrico 15,2% menor em relação ao grupo Cont ($P < 0,05$, Fig. 12A e C). Por outro lado, não se observou diferença estatística entre os outros grupos ($P > 0,05$, Fig. 12A e C).

No período pós-tratamento com metformina, nenhum dos grupos apresentaram diferenças entre si ($P > 0,05$, Fig. 12A e D).

Quanto à ingestão hídrica nas fêmeas no período pré-tratamento, observou-se uma ingestão hídrica 18,8% menor no grupo Ob e no grupo Ob Met em comparação ao grupo Cont ($P<0,05$, Fig 12E-F). Ao passo que não foram observadas diferenças estatísticas entre os ratos tratados com metformina e não tratados em ambos os grupos Cont e Ob ($P>0,05$, Fig 12E-F).

Durante o período de tratamento com metformina, o grupo Ob apresentou consumo hídrico 11,3% maior em comparação ao grupo Cont ($P<0,05$, Fig 12E-G) e o grupo Ob Met apresentou ingestão hídrica sem diferença do que o grupo Ob ($P>0,05$, Fig. 12E e G), se igualando ao grupo Cont ($P>0,05$, Fig. 12E e G).

No período pós-tratamento, o consumo hídrico do grupo Ob foi 7% maior quando comparado ao grupo Cont Met ($P<0,05$, Fig. 12E e H), sendo que não diferiu estatisticamente do grupo Cont ($P>0,05$, Fig. 12E e H). O grupo Ob Met não apresentou diferença quando comparado aos demais grupos ($P>0,05$, Fig. 12E e H); e o grupo Cont Met apresentou semelhança ao grupo Cont ($P>0,05$, Fig. 12E e G).

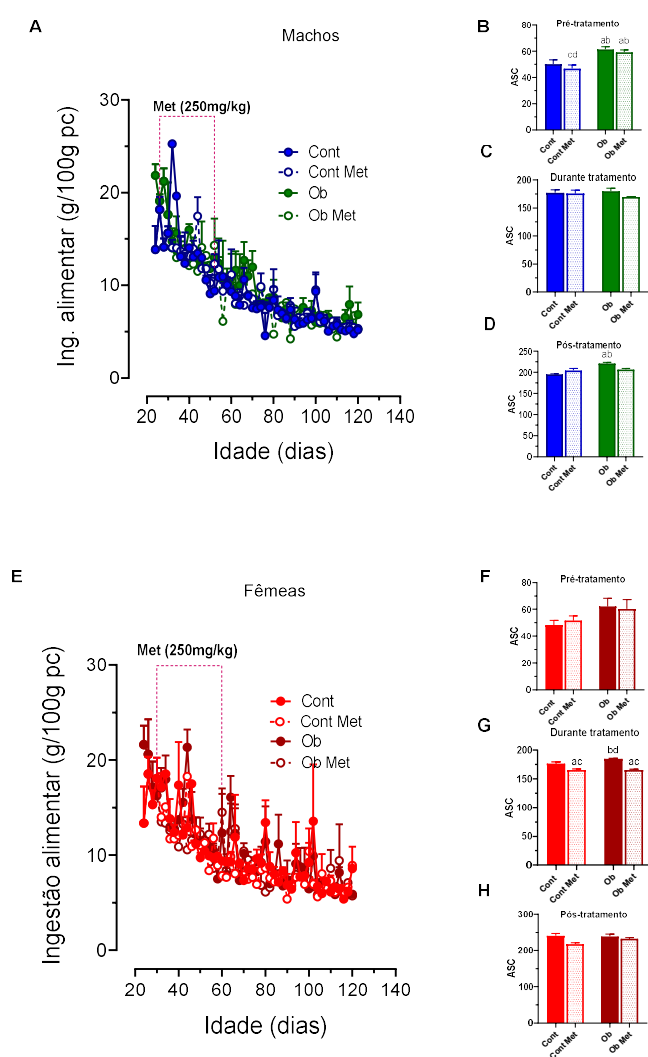


Figura 11. Ingestão alimentar de machos (A, B, C e D) e fêmeas (E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 2-4 ninhadas, machos e fêmeas, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a)* Cont; *b)* Cont Met; *c)* Ob; *d)* Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

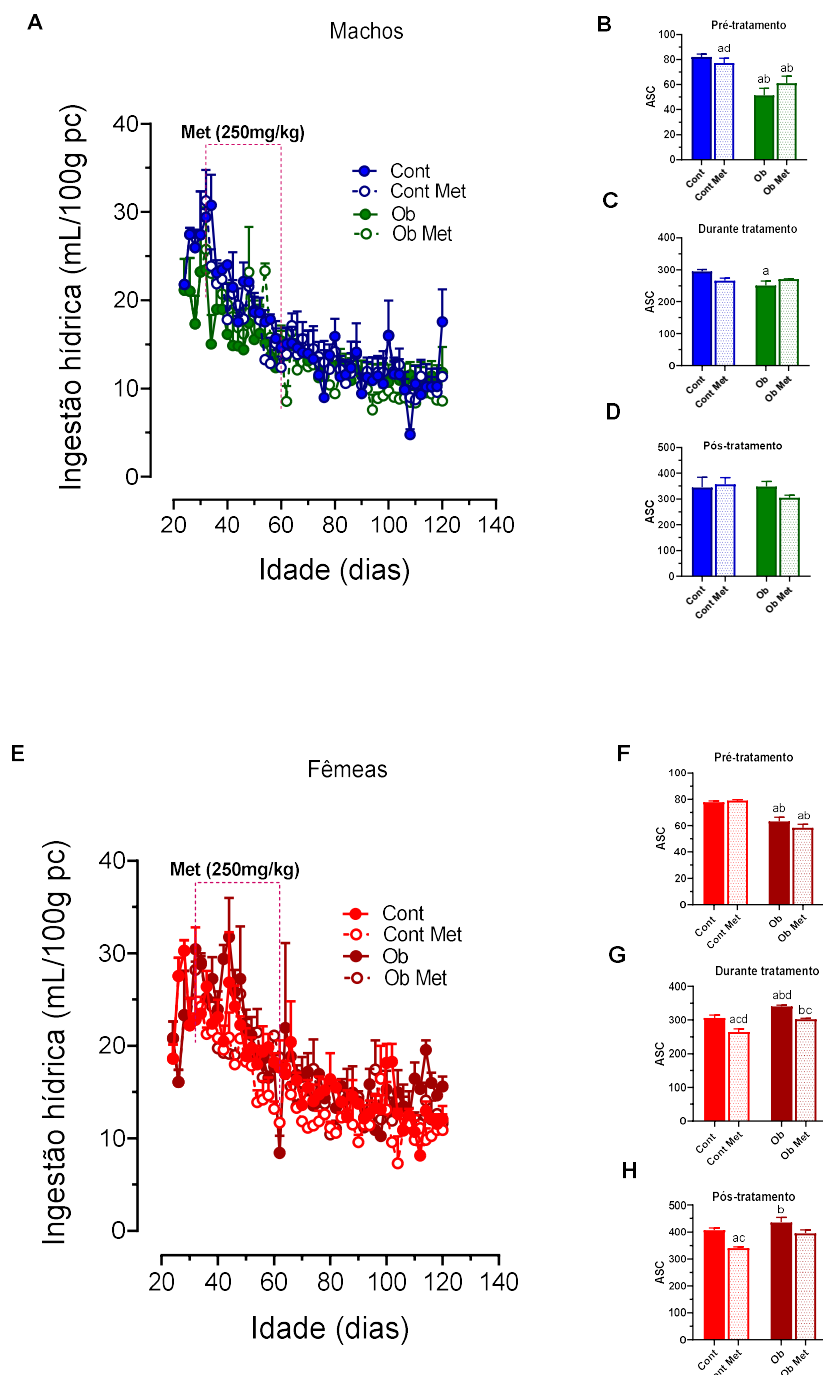


Figura 12. Ingestão hídrica de machos (A, B, C e D) e fêmeas(E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 2-4 ninhadas, machos e fêmeas, os quais foram submetidos à análise

variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a)* Cont; *b)* Cont Met; *c)* Ob; *d)* Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

4.8 Avaliação do peso de órgãos

O peso do fígado nos machos, aumentou em 14% nos ratos do grupo Ob quando comparado ao Cont ($P < 0,05$, Fig. 13A), enquanto nenhuma diferença estatística foi observada entre os demais grupos ($P > 0,05$, Fig. 13A). Da mesma forma, nas fêmeas, temos um aumento de 14,21% no peso do fígado das ratas Ob em relação ao grupo Cont e de 14% relacionado ao grupo Cont Met ($P < 0,05$, Fig. 13C).

Quanto ao peso do pâncreas, os ratos machos não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 13B). Nas fêmeas, também não observamos diferença no peso do pâncreas entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 13D).

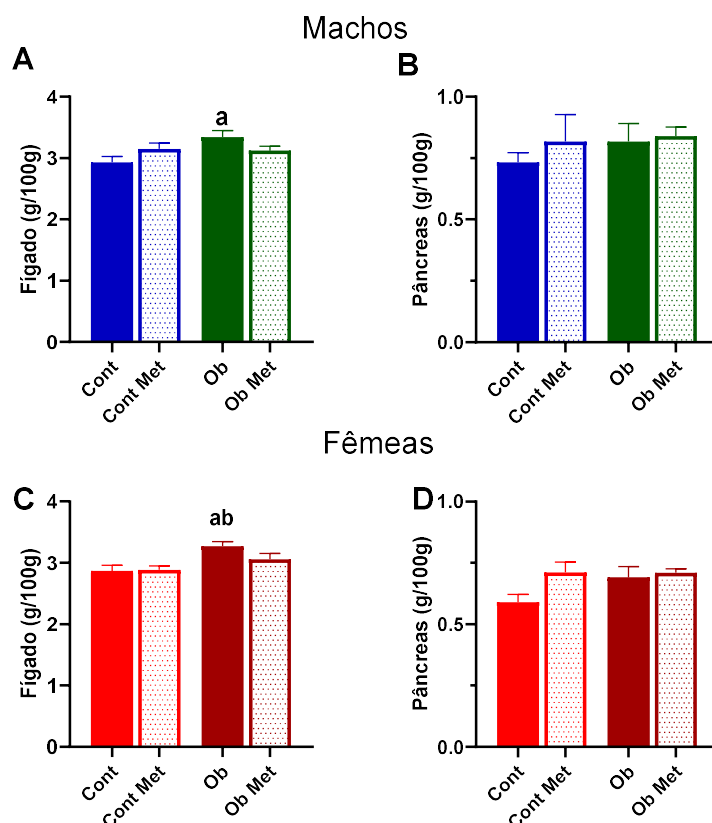


Figura 13. Efeito do tratamento com metformina sobre o peso corporal e de órgãos corporais. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a)* Cont; *b)* Cont Met; *c)* Ob; *d)* Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

Referente ao índice de adiposidade, os machos do grupo Ob se apresentaram 26,2% maiores em relação ao grupo Cont, enquanto os ratos do grupo Ob Met, apresentaram redução de 17% em comparação ao grupo Ob ($P < 0,05$, Fig. 14A). Não foram observadas diferenças estatísticas entre os demais grupos ($P > 0,05$, Fig. 14A).

O índice de massa magra dos ratos machos Ob se apresentou 23,8% menor do que o dos ratos Cont ($P < 0,05$, Fig. 14B) sem mais diferenças entre os demais grupos ($P > 0,05$). Quanto ao peso da gordura marrom, não apresentou diferença entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 14C).

Nas fêmeas, as ratas do grupo Ob tiveram aumento de 23% no índice de adiposidade em comparação com os ratas Cont ($P < 0,05$, Fig. 14D), enquanto nenhuma diferença estatística foi observada entre os demais grupos ($P > 0,05$, Fig. 14D).

O índice de massa magra das ratas Ob apresentou redução de 15,6% quando comparado ao grupo Cont ($P < 0,05$, Fig. 14E) e nenhuma outra diferença foi encontrada entre os demais grupos ($P > 0,05$). Em relação ao peso da gordura marrom, não se observou diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$, Fig. 14F).

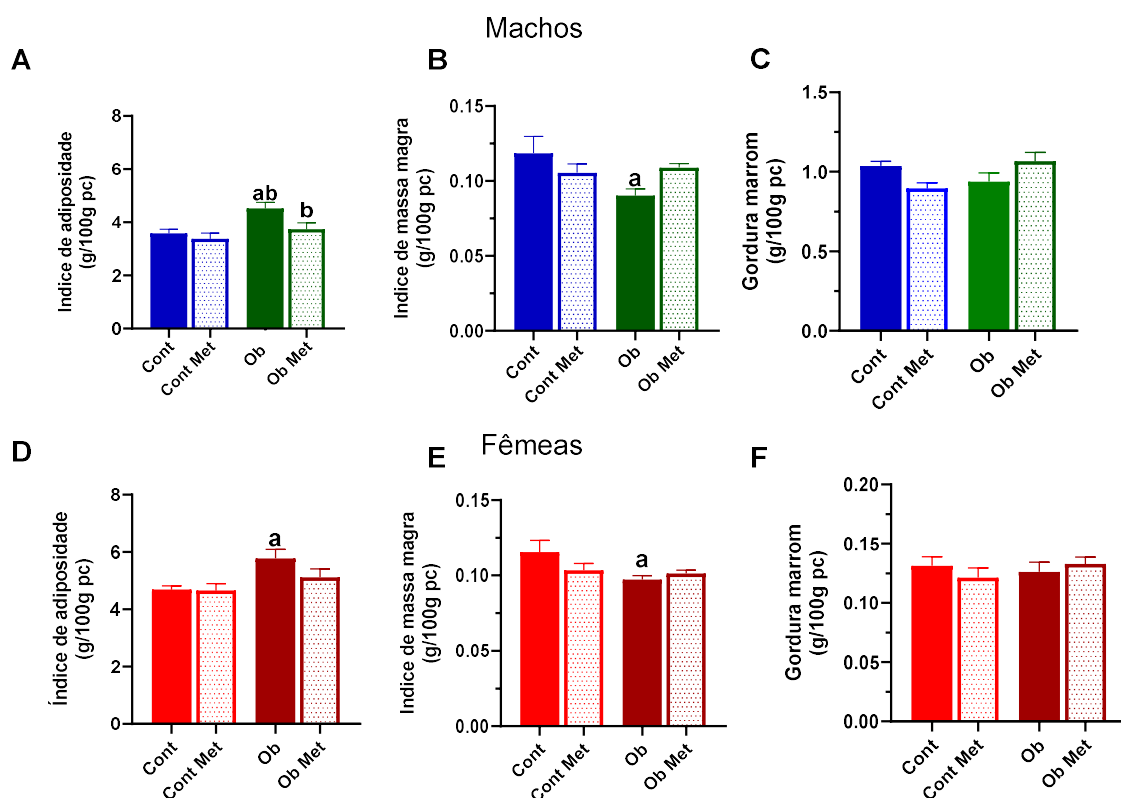


Figura 14. Composição corporal e peso da gordura marrom em machos aos 120 dias de vida (A, B, C e D) e fêmeas (E, F, G e H). Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos, os quais foram submetidos à análise de variância de

uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) Cont; *b*) Cont Met; *c*) Ob; *d*) Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

4.9 Parâmetros bioquímicos aos 120 dias

Os valores bioquímicos em plasma dos filhotes machos apresentou um aumento no colesterol total de 81,82% no grupo Ob comparado ao grupo Cont e uma diminuição de 26,35% no grupo Ob Met quando comparado com o Ob, se igualando ao Cont ($P<0,001$, Fig.15A).

No colesterol HDL observamos uma diminuição de 33,80% nos Ob em relação ao Cont ($P<0,01$, Fig. 15B), em proteínas totais uma redução do grupo Ob de 23,59% a menos em relação ao Cont ($P<0,001$, Fig.15C) um aumento de 26,28% em triglicérides do grupo Ob em relação com Cont e sem apresentar diferença estatística entre Cont e Cont Met ($P<0,01$, Fig. 15F), 6,48% elevado em índice TyG relacionando grupo Ob com Cont ($P<0,01$, Fig. 15I), aumento de 86,55% nos níveis de glicose do grupo Ob em relação com Cont.

Na análise de AST obtivemos um aumento de 48,62% nos Ob comparados com os Cont e de 24,56% relacionando grupo Ob Met com Cont ($P<0,001$, Fig.15D), já em ALT o aumento do grupo Ob foi de 22% em relação ao Cont e sem demais diferenças entre os grupos ($P<0,01$, Fig.15E). Não observamos diferença estatística entre os grupos experimentais quanto aos valores dos níveis de colesterol VLDL comparando grupo Ob ao Cont, somente do grupo Ob relacionado ao Cont Met ($P<0,05$, Fig.15C).

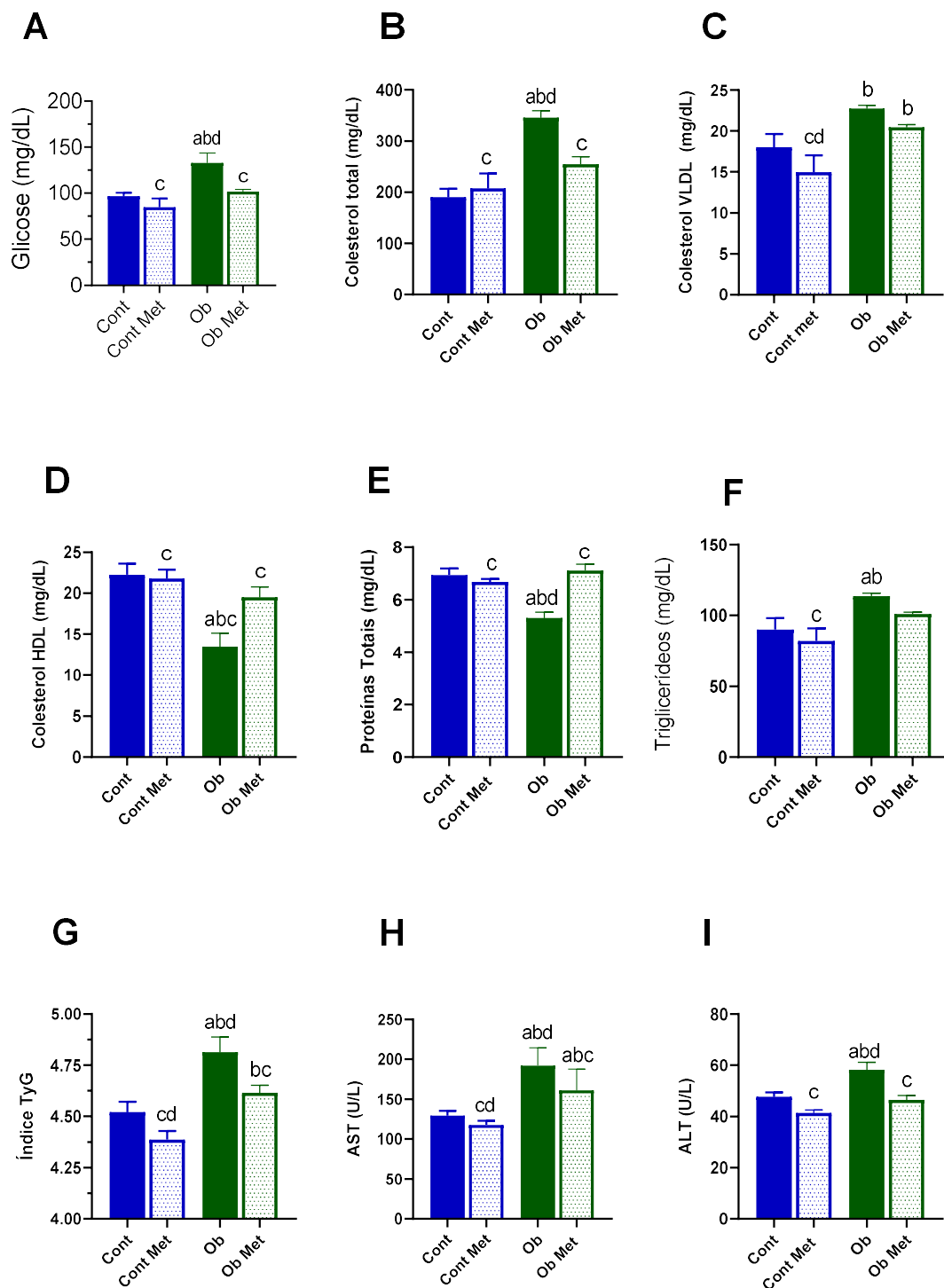


Figura 15. Parâmetros bioquímicos dos machos aos 120 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde a) Cont; b) Cont Met; c) Ob; d) Ob Met.

Nos resultados bioquímico em fêmeas temos um aumento de 46,47% do colesterol VLDL no grupo Ob em relação ao Cont e no grupo Ob Met uma redução de 31,95% quando comparado as Ob ($P<0,01$, Fig.16A), aumento de 53,11% do colesterol total em Ob relacionado com Cont e redução de 22,41% no grupo Ob Met em relação ao Ob ($P<0,05$, Fig. 16B) diminuição de 14,74% em proteínas totais nas fêmeas Ob comparadas com as Cont ($P<0,05$, Fig16E), aumento de 37,53% em triglicerídeos Ob em comparação com Cont ($P<0,05$, Fig.16F), aumento de 5,77% em índice TyG no grupo Ob em relação ao Cont e redução de 3,32% no grupo Ob Met relacionado com Ob ($P<0,05$, Fig.16G). Na análise de AST obtivemos um aumento de 30,17% nos Ob comparados com os Cont ($P<0,05$, Fig. 16H), já em ALT o aumento do grupo Ob foi de 40,83% em relação ao Cont ($P<0,001$, Fig.16I) e sem demais diferenças entre os grupos. Não observamos diferença estatística entre os grupos experimentais quanto aos valores dos níveis de glicose, colesterol HDL ($P>0,05$, Fig.16E-I).

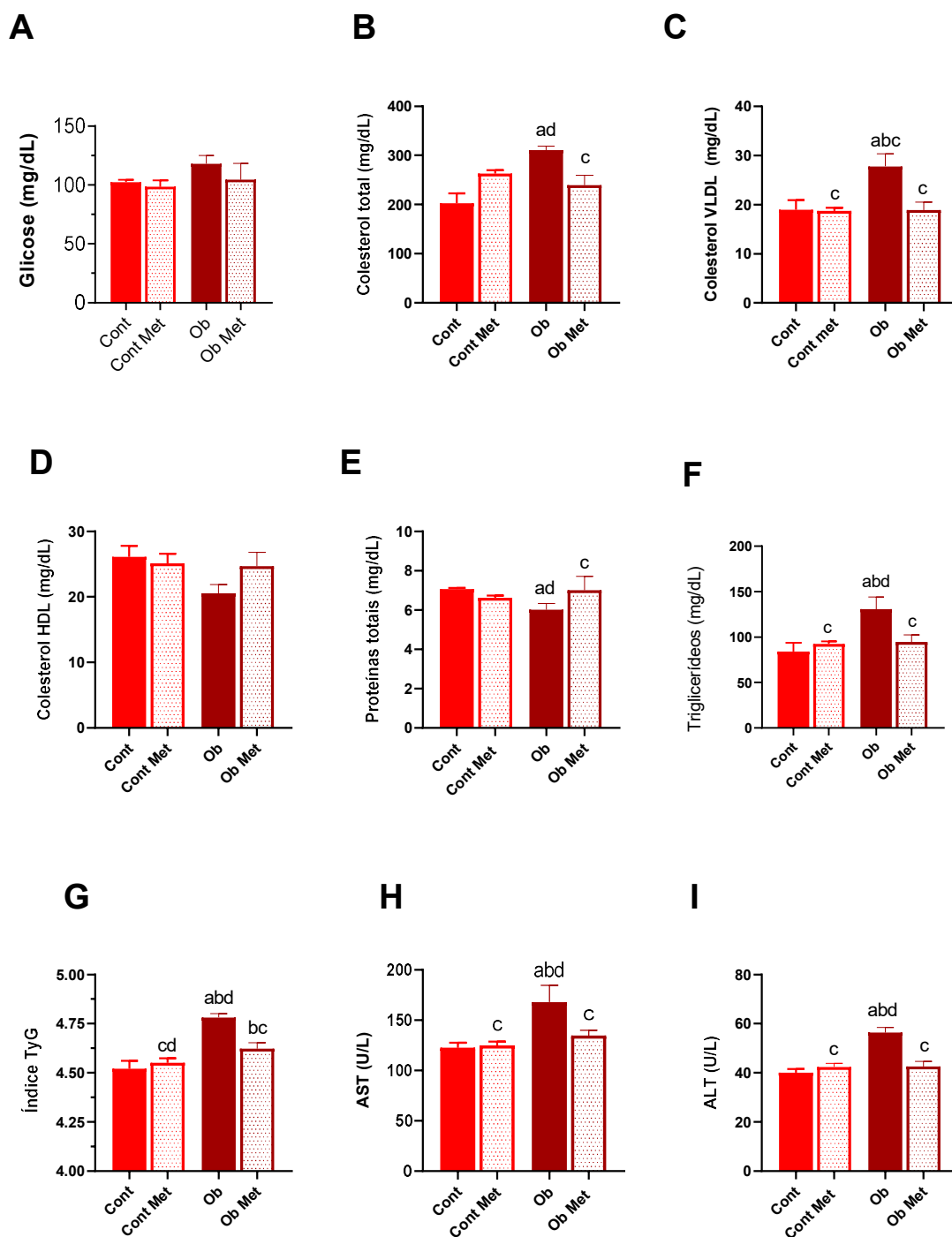


Figura 16. Parâmetros bioquímicos das fêmeas aos 120 dias. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (one-way ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde a) Cont; b) Cont Met; c) Ob; d) Ob Met.

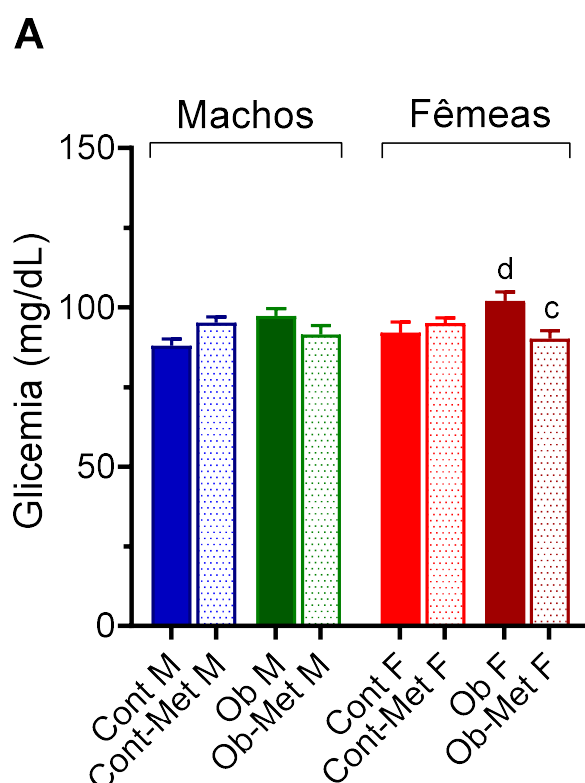
4.8 Avaliação da homeostase glicêmica-insulinêmica durante o ipGTT e ipITT

Apesar dos ratos Ob machos apresentarem glicemia de jejum 10,57% maior que os ratos Cont, a glicemia de jejum não diferiu estatisticamente entre os ratos do sexo

masculino ($P>0,05$, Fig. 17A). No sexo feminino, as ratas Ob apresentaram glicemia de jejum 10,87% maior que as Cont, embora também não tenham sido estatisticamente diferentes ($P>0,05$, Fig. 17A). Por outro lado, as ratas Ob Met apresentaram glicemia de jejum 11,55% menor quando comparadas as ratas Ob ($P<0,05$, Fig. 17A).

Durante o ipGTT, os ratos Ob machos apresentaram incremento glicêmico 17,34% maior que os ratos Cont ($P<0,01$, Fig. 17B–C), ao passo que os ratos Ob-Met apresentaram aumento de 13,36% em relação aos ratos Cont ($P<0,05$, Fig. 17B–C). No sexo masculino, não se observou diferença estatística entre os grupos Ob Met *versus* Ob e nem entre os ratos Cont Met *versus* Cont ($P>0,05$, Fig. 17B–C).

No sexo feminino, durante o ipGTT, as ratas Ob apresentaram aumento de 13,44% no incremento glicêmico ($P<0,05$, Fig. 17D–E), enquanto as ratas Ob-Met apresentaram incremento glicêmico 12,22% menor quando comparadas as ratas Ob ($P<0,001$, Fig. 17D–E), equiparando-se aos valores glicêmicos do grupo Cont ($P>0,05$, Fig. 17D–E). Não se observou diferença estatística entre os grupos Cont-Met *versus* Cont ($P>0,05$, Fig. 17D–E).



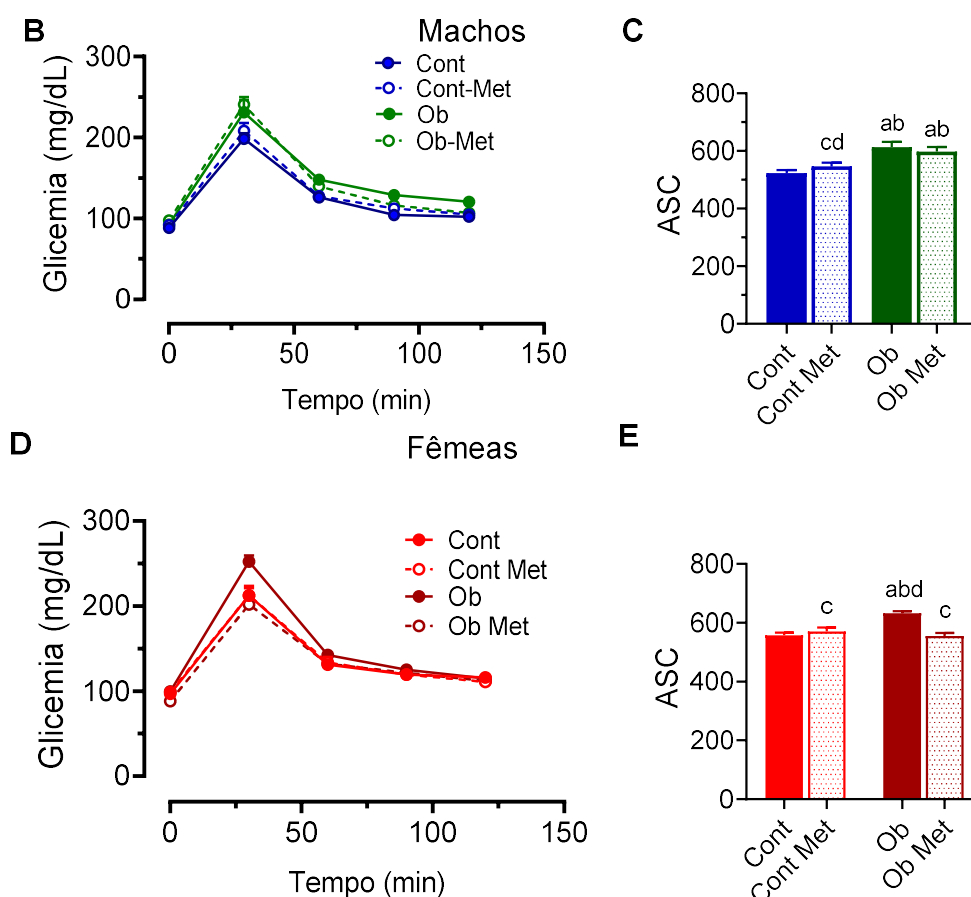


Figura 17. Homeostase glicêmica durante jejum e ipGTT. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde a) Cont; b) Cont Met; c) Ob e d) Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

Quando comparados aos ratos Cont machos durante o ipITT, os ratos Ob apresentaram Kitt 79,47% menor ($P < 0,05$, Fig. 18A–B), enquanto que o grupo Ob-Met apresentou valores de Kitt 69,61% menores que os dos ratos Cont ($P < 0,05$, Fig. 18A–B).

Apesar de não diferirem estatisticamente entre si, os ratos Cont-Met apresentaram Kitt 35,58% menor que os ratos Cont ($P > 0,05$, Fig. 18A–B), já os ratos Ob-Met apresentaram aumento de 48,03% em relação aos ratos Ob, porém não estatisticamente diferente ($P > 0,05$, Fig. 18A–B).

No sexo feminino, as ratas Ob apresentaram Kitt 84,85% menor que as ratas Cont ($P < 0,05$, Fig. 18C–D), enquanto as ratas Ob-Met apresentaram Kitt aumentado em 95% em relação as ratas Ob ($P < 0,001$, Fig. 18C–D) e em 44,73% em relação as ratas Cont, embora não tenham diferido estatisticamente delas ($P > 0,05$, Fig. 18C–D).

Apesar de não diferirem estatisticamente entre si, as ratas Cont-Met apresentaram Kitt 62,83% menor que as ratas Cont ($P>0,05$, Fig. 18C–D).

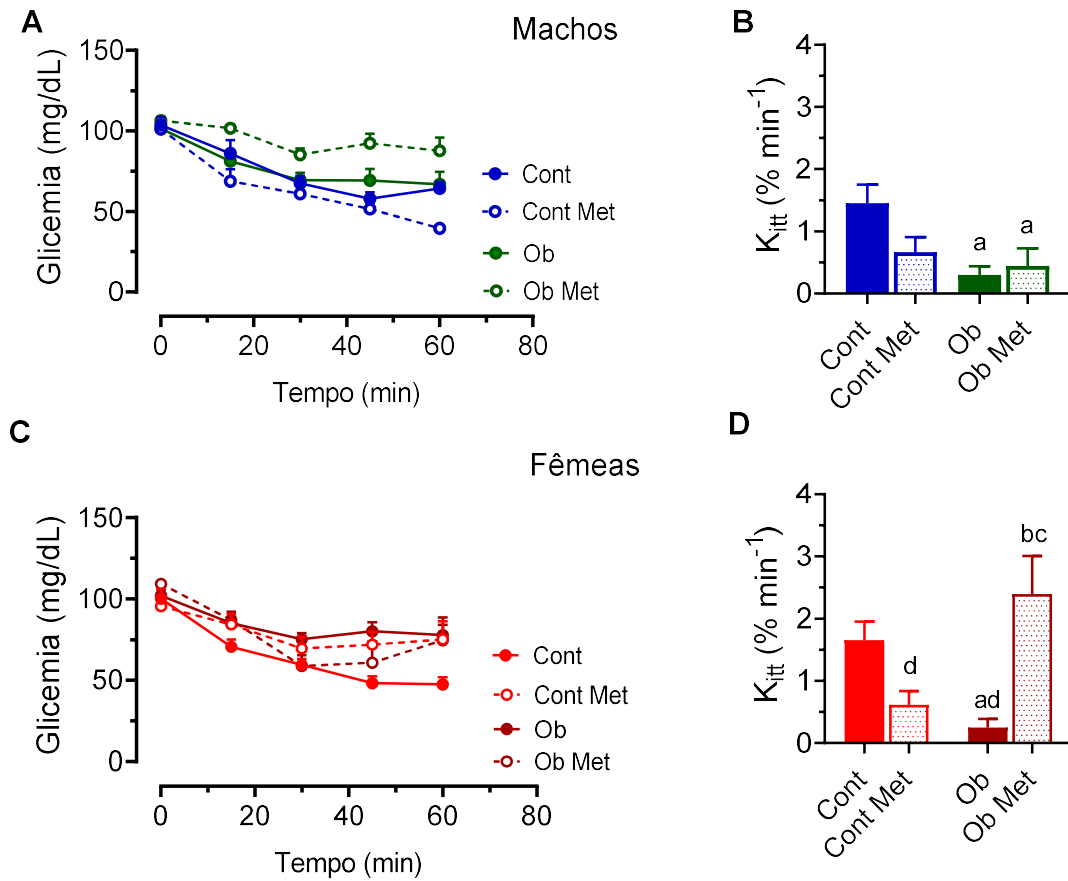


Figura 18. Homeostase glicêmica durante ipITT. Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média de 8-12 animais por grupo experimental, em ambos os sexos, os quais foram submetidos à análise de variância de uma via (*one-way* ANOVA). As letras sobre as barras representam diferença estatística entre os grupos, onde *a*) Cont; *b*) Cont Met; *c*) Ob e *d*) Ob Met, de ambos os sexos apresentados separadamente.

5. DISCUSSÃO

Nesse trabalho mostramos que a ingestão materna de uma dieta rica em calorias durante a lactação foi capaz de promover obesidade materna associada a uma subsequente indução do desenvolvimento precoce de maior ganho de peso na prole do sexo masculino. Esse dado corrobora achados prévios em que mães lactantes que ingeriram dieta hipercalórica tiveram maior índice de adiposidade, bem como também filhotes com peso corporal aumentado durante o período da lactação (Gomes, Bueno *et al.*, 2018). É válido ressaltar que no referido estudo os autores avaliaram somente a prole do sexo masculino (Gomes, Bueno *et al.*, 2018), ao passo que em nosso trabalho, mostramos o efeito comparativo entre sexos, na mesma ninhada. Diante disto, nosso trabalho mostra pela primeira vez, que o *catch-up* de crescimento observado na prole lactante masculina se deu já nos primeiros dias de vida, efeito este somente observado em fêmeas mais tardiamente durante o período da lactação.

Nossos resultados fornecem suporte para perceber o quão impactante pode ser a obesidade materna sobre o ganho de peso dos filhotes durante o período de lactação, destacando aspectos cruciais da influência da alimentação materna no desenvolvimento da programação de um *status* de saúde ou de doença dos descendentes, o que pode se manter ao longo da vida da sua prole. Dietas ricas em gordura têm consequências graves na composição corporal neonatal, tais como ganho de peso, aumento do acúmulo de gordura nos tecidos periféricos associadas as alterações metabólicas que ocorrem nas mães obesas, podendo comprometer a composição do leite (Wahlig, Bales *et al.*, 2012).

Como mostrado em estudos prévios, mães alimentadas com dieta hipercalórica desde o período pré-concepção (Franco, Fernandes *et al.*, 2012), ou mesmo somente durante a lactação (Gomes, Bueno *et al.*, 2018) têm leite mais calórico, como apresentado em nosso estudo. Nesse contexto, é evidente que o ambiente materno obesogênico altera a composição do leite materno, fato que parece contribuir para a obesidade precoce dos neonatos. Somando-se a hiperfagia dos filhos de mães obesas, em ambos os sexos, observada em nosso estudo, é possível inferir que esses eventos sejam fatores de risco potencial para o desenvolvimento de obesidade ao longo da vida.

Nos presentes resultados, observamos que mães alimentadas com uma dieta hipercalórica e enriquecida com sacarose durante a lactação exibiram níveis elevados de ALT e AST. Esses resultados são indicativos de lesão hepática e disfunção metabólica induzidas pela dieta. O aumento do peso do fígado (hepatomegalia) e os altos níveis de

ALT e AST são marcadores clássicos de estresse hepático e inflamação. ALT e AST são enzimas hepáticas que, quando presentes em níveis elevados no sangue, sugerem danos nas células do fígado, muitas vezes associados à esteatose hepática, inflamação e até fibrose. Nossos achados corroboram estudos prévios que mostraram que uma dieta materna rica em gorduras saturadas e sacarose pode prejudicar a função hepática, resultando em alterações no perfil lipídico e no equilíbrio redox do fígado (Liu, Lee *et al.*, 2023). As mesmas alterações foram observadas nos filhos de mães Obese, sugerindo que essa alteração materna prejudica a função hepática da prole da mesma forma.

No que tange o efeito sexo-dependente quanto ao desenvolvimento de doenças metabólicas, evidências apontam que os homens são mais propensos a desenvolver obesidade, resistência à insulina e hiperglicemia (Tramunt, Smati *et al.*, 2020). Dito isso, considerando-se o período pós-lactação, as fêmeas Ob não apresentaram ganho de peso significativo após o período de adolescência quando comparadas as fêmeas Cont, dado que corrobora a normofagia nas fêmeas Ob. Por outro lado, os machos Ob demonstraram ganho de peso significativamente maior em comparação aos Cont durante todo o período experimental, o que foi condizente com a hiperfagia também observada nestes ratos. Este resultado sugere possíveis influências de hormônios sexuais atuando sobre as vias de regulação do balanço energético, uma vez que o estrogênio exerce um papel de proteção metabólica em fêmeas, agindo de modo a manter a composição corporal e homeostase glicêmica (Kautzky-Willer, Harreiter *et al.*, 2016).

Como demonstrado em modelos experimentais, o estrogênio protege principalmente contra o desenvolvimento de obesidade induzidas por dieta rica em gordura, efeito protetor que é totalmente abolido pela ovariectomia bilateral (Riant, Waget *et al.*, 2009; Handgraaf, Riant *et al.*, 2013). Neste âmbito, ressaltamos ser um dos pontos fracos em nosso trabalho, a não quantificação dos níveis de hormônios como a testosterona e estrogênio, bem como de vias de sinalização envolvendo hormônios sexuais e processos associados ao balanço energético (ingestão alimentar e termogênese por exemplo).

Em adição, apesar das evidências apontarem para o sexo masculino como sendo mais susceptível ao desenvolvimento de diabetes *mellitus* tipo 2 (Tramunt, Smati *et al.*, 2020), em nosso trabalho mostramos que as fêmeas mesmo não sendo mais afetadas quanto ao desenvolvimento de obesidade, foram mais afetadas quanto ao desequilíbrio da homeostase glicêmica. Apesar de ambos os sexos mostrarem intolerância à glicose como efeito de longo prazo associado à programação precoce devido à obesidade materna, as

fêmeas Ob apresentam resistência periférica à insulina bem mais proeminente do que os machos.

Por outro lado, o efeito do tratamento com metformina apenas durante a adolescência, foi capaz de modular a sensibilidade periférica à insulina e mecanismos de captação de glicose nas fêmeas, porém não nos machos. Embora não tenhamos avaliado os mecanismos envolvidos na modula da homeostase glicêmica em fêmeas e não em machos, o que constitui uma das fragilidades de nosso estudo, conhecê-los se faz necessário para uma melhor compreensão do processo, bem como para inferir novas possibilidades terapêuticas neste âmbito.

Como observado em nosso estudo, a ingestão crônica de metformina na água de beber levou os animais a uma redução de peso corporal, fato que nos levar a sugerir um possível efeito do GDF-15 nos centros reguladores do balanço energético, uma vez que o GDF-15 age como um mediador chave no processo de perda de peso induzida pela metformina (Ouyang, Isnard *et al.*, 2020), bem como um fator de proteção importante nas fisiopatologias como o diabetes *mellitus* tipo 2 (Eddy e Trask, 2021), o que corrobora nossos dados quanto a homeostase glicêmica, visto que os ratos tratados com metformina também apresentaram melhora nos níveis glicêmicos, na tolerância à glicose e na sensibilidade periférica à insulina. A metformina aumenta a secreção de GDF-15, que se liga exclusivamente ao receptor da família do fator neurotrófico derivado de células gliais tipo alfa com isso promovendo a perda de peso corporal (Ouyang, Isnard *et al.*, 2020). Evidências também sugerem que essa perda de peso, em humanos, se deve à modulação dos centros reguladores do apetite hipotalâmicos e à alteração no microbiota intestinal (Yerevanian e Soukas, 2019).

Os resultados do uso da metformina apresentaram efeitos positivos em relação ao ganho de peso, diminuindo o peso corporal em ratos machos e fêmeas com obesidade e que ingeriram metformina, igualando aos grupos controle. Esse efeito de redução se mostrou durante e permaneceu no pós-tratamento nos animais machos, e apenas durante o uso do medicamento nas fêmeas. Destacando que as respostas se apresentaram de forma específicas por gênero durante os períodos de tratamento e pós-tratamento, indicando que houve efeitos diferenciados nos ratos machos e fêmeas, como na redução significativa de peso durante o tratamento, que ocorreu especialmente nos machos.

Quanto ao efeito duradouro da metformina sobre o peso corporal, apenas nos machos foi observado um resultado de programação metabólica causada pelo uso da metformina no período da adolescência. Ao passo que esse efeito positivo de longa

duração da metformina foi observado somente nas fêmeas, quanto a regulação da homeostase glicêmica (melhora no quadro de intolerância à glicose e resistência à insulina) que se manteve mesmo após 60 dias do encerramento do tratamento com a metformina. A manutenção desses efeitos pós-tratamento destaca a importância da continuidade da investigação para entender melhor os mecanismos subjacentes e otimizar o uso da metformina como uma intervenção potencial no tratamento de doenças crônicas não transmissíveis tais como a obesidade e o diabetes *mellitus* tipo 2.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados revelam que a ingestão materna de dieta rica em calorias somente durante o período de lactação, promove obesidade tanto na mãe quanto nos descendentes de ambos os sexos, embora com maior magnitude no sexo masculino; bem como desajuste da homeostase glicêmica da prole, em ambos os sexos.

Em adição também se conclui que o tratamento com metformina, somente durante a adolescência, foi capaz de mitigar o desenvolvimento da obesidade no sexo feminino, mas não no masculino; bem como de bloquear o desenvolvimento de resistência à insulina no sexo feminino, mas não no masculino.

É intrigante notar que os efeitos foram específicos por gênero, com respostas diferenciadas entre machos e fêmeas, inclusive na programação metabólica durante a adolescência. A continuidade da investigação é crucial para esclarecer completamente os mecanismos subjacentes e otimizar o uso da metformina como uma potencial intervenção no combate à obesidade e resistência à insulina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, B.; SULTANA, R.; GREENE, M. W. Adipose tissue and insulin resistance in obese. **Biomed Pharmacother**, v. 137, p. 111315, May 2021. ISSN 1950-6007 (Electronic)

0753-3322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33561645> >.

ARANDA, S.; MAS, G.; DI CROCE, L. Regulation of gene transcription by Polycomb proteins. **Sci Adv**, v. 1, n. 11, p. e1500737, Dec 2015. ISSN 2375-2548 (Print)

2375-2548 (Electronic)

2375-2548 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26665172> >.

BADILLO-SUAREZ, P. A.; RODRIGUEZ-CRUZ, M.; NIEVES-MORALES, X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 22, n. 3, p. 171-191, Sep 2017. ISSN 1573-7039 (Electronic)

1083-3021 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28653126> >.

BAILEY, C. J. Metformin: historical overview. **Diabetologia**, v. 60, n. 9, p. 1566-1576, Sep 2017. ISSN 1432-0428 (Electronic)

0012-186X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28776081> >.

BARAZZONI, R. et al. Insulin resistance in obesity: an overview of fundamental alterations. **Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity**, v. 23, n. 2, p. 149-157, 2018/04/01 2018. ISSN 1590-1262. Disponível em: < <https://doi.org/10.1007/s40519-018-0481-6> >.

BARKER, D. J. A new model for the origins of chronic disease. **Med Health Care Philos**, v. 4, n. 1, p. 31-5, 2001. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11315417 >.

BARKER, D. J. et al. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. **Diabetologia**, v. 36, n. 1, p. 62-7, Jan 1993. ISSN 0012-186X (Print)

0012-186X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8436255> >.

BAY, J. L.; MORTON, S. M.; VICKERS, M. H. Realizing the potential of adolescence to prevent transgenerational conditioning of noncommunicable disease risk: multi-sectoral design frameworks. Healthcare, 2016. MDPI. p.39.

BERNARDIS, L.; PATTERSON, B. J. J. O. E. Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. v. 40, n. 4, p. 527-528, 1968. ISSN 0022-0795.

BOURET, S. G.; DRAPER, S. J.; SIMERLY, R. B. J. S. Trophic action of leptin on hypothalamic neurons that regulate feeding. v. 304, n. 5667, p. 108-110, 2004. ISSN 0036-8075.

BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods Enzymol**, v. 52, p. 302-10, 1978. ISSN 0076-6879 (Print)

0076-6879 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/672633> >.

BURDGE, G. C.; LILLYCROP, K. A. Nutrition, epigenetics, and developmental plasticity: implications for understanding human disease. **Annu Rev Nutr**, v. 30, p. 315-39, Aug 21 2010. ISSN 1545-4312 (Electronic)

0199-9885 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20415585> >.

BURDGE, G. C. et al. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. **Br J Nutr**, v. 97, n. 3, p. 435-9, Mar 2007. ISSN 0007-1145 (Print)

0007-1145 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17313703 >.

CHONG, A. C. et al. Central insulin signaling modulates hypothalamus-pituitary-adrenal axis responsiveness. **Mol Metab**, v. 4, n. 2, p. 83-92, Feb 2015. ISSN 2212-8778 (Electronic)

2212-8778 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25685696> >.

COLOMBO, G. et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. v. 1019, p. 178-190, 2016. ISSN 1570-0232.

COLOMBO, L. et al. Breastfeeding determinants in healthy term newborns. v. 10, n. 1, p. 48, 2018. ISSN 2072-6643.

COOPER, C. J. N. David Barker (1938–2013). v. 502, n. 7471, p. 304-304, 2013. ISSN 0028-0836.

DE FREITAS MATHIAS, P. C. et al. Cholinergic-pathway-weakness-associated pancreatic islet dysfunction: a low-protein-diet imprint effect on weaned rat offspring. v. 11, n. 5, p. 484-491, 2020. ISSN 2040-1744.

DE JONG, K. A. et al. Maternal high fat diet induces early cardiac hypertrophy and alters cardiac metabolism in Sprague Dawley rat offspring. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, v. 28, n. 6, p. 600-609, Jun 2018. ISSN 1590-3729 (Electronic)

0939-4753 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29691147> >.

DE LORENZO, A. et al. New obesity classification criteria as a tool for bariatric surgery indication. v. 22, n. 2, p. 681, 2016.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. Low-protein diet in puberty impairs testosterone output and energy metabolism in male rats. **J Endocrinol**, v. 237, n. 3, p. 243-254, Jun 2018. ISSN 1479-6805 (Electronic)

0022-0795 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29599416> >.

DE OLIVEIRA, J. C. et al. Poor pubertal protein nutrition disturbs glucose-induced insulin secretion process in pancreatic islets and programs rats in adulthood to increase fat accumulation. **J Endocrinol**, v. 216, n. 2, p. 195-206, 2013. ISSN 1479-6805 (Electronic)

0022-0795 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=23151360 >.

DEFRONZO, R. A.; GOODMAN, A. M. Efficacy of metformin in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. The Multicenter Metformin Study Group. **N Engl J Med**, v. 333, n. 9, p. 541-9, Aug 31 1995. ISSN 0028-4793 (Print)

0028-4793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7623902> >.

DIETERICH, C. M. et al. Breastfeeding and health outcomes for the mother-infant dyad. v. 60, n. 1, p. 31-48, 2013. ISSN 0031-3955.

DOS SANTOS, B. G. et al. Puberty as a DOHaD programming window: high-fat diet induces long-term hepatic dysfunction in male rats. **J Dev Orig Health Dis**, p. 1-9, Nov 13 2023. ISSN 2040-1752 (Electronic)

2040-1744 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37955113> >.

EDDY, A. C.; TRASK, A. J. Growth differentiation factor-15 and its role in diabetes and cardiovascular disease. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 57, p. 11-18, Feb 2021. ISSN 1879-0305 (Electronic)

1359-6101 (Print)

1359-6101 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33317942> >.

FORETZ, M.; GUIGAS, B.; VIOLLET, B. J. N. R. E. Understanding the glucoregulatory mechanisms of metformin in type 2 diabetes mellitus. v. 15, n. 10, p. 569-589, 2019. ISSN 1759-5029.

FRANCO, C. C. et al. Protective effect of metformin against walker 256 tumor growth is not dependent on metabolism improvement. **Cell Physiol Biochem**, v. 34, n. 6, p. 1920-32, 2014. ISSN 1421-9778 (Electronic)

1015-8987 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25500480> >.

FRANCO, J. et al. Maternal high-fat diet induces obesity and adrenal and thyroid dysfunction in male rat offspring at weaning. v. 590, n. 21, p. 5503-5518, 2012. ISSN 0022-3751.

GARDNER, D. G.; SHOBACK, D. **Endocrinologia Básica e Clínica de Greenspan (Lange)**. McGraw Hill Brasil, 2013. ISBN 8580551587.

GOMES, R. M. et al. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. **J Nutr Biochem**, v. 61, p. 24-32, Nov 2018. ISSN 1873-4847 (Electronic)

0955-2863 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30179726> >.

HABIG, W. H. et al. The identity of glutathione S-transferase B with ligandin, a major binding protein of liver. v. 71, n. 10, p. 3879-3882, 1974. ISSN 0027-8424.

HANDGRAAF, S. et al. Prevention of obesity and insulin resistance by estrogens requires ERalpha activation function-2 (ERalphaAF-2), whereas ERalphaAF-1 is dispensable. **Diabetes**, v. 62, n. 12, p. 4098-108, Dec 2013. ISSN 1939-327X (Electronic)

0012-1797 (Print)

0012-1797 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23903353> >.

HEIJMANS, B. T. et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 105, n. 44, p. 17046-9, Nov 4 2008. ISSN 1091-6490 (Electronic)

0027-8424 (Linking). Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18955703 >.

KAUTZKY-WILLER, A.; HARREITER, J.; PACINI, G. Sex and Gender Differences in Risk, Pathophysiology and Complications of Type 2 Diabetes Mellitus. **Endocr Rev**, v. 37, n. 3, p. 278-316, Jun 2016. ISSN 1945-7189 (Electronic)

0163-769X (Print)

0163-769X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27159875> >.

KING, P.; PEACOCK, I.; DONNELLY, R. The UK prospective diabetes study (UKPDS): clinical and therapeutic implications for type 2 diabetes. **Br J Clin Pharmacol**, v. 48, n. 5, p. 643-8, Nov 1999. ISSN 0306-5251 (Print)

1365-2125 (Electronic)

0306-5251 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10594464> >.

LAMOIA, T. E.; SHULMAN, G. I. Cellular and Molecular Mechanisms of Metformin Action. **Endocr Rev**, v. 42, n. 1, p. 77-96, Jan 28 2021. ISSN 1945-7189 (Electronic)

0163-769X (Print)

0163-769X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32897388> >.

LI, J. et al. Metformin limits osteoarthritis development and progression through activation of AMPK signalling. v. 79, n. 5, p. 635-645, 2020. ISSN 0003-4967.

LISBOA, P. C. et al. Can breastfeeding affect the rest of our life? **Neuropharmacology**, v. 200, p. 108821, Dec 1 2021. ISSN 1873-7064 (Electronic)

0028-3908 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34610290> >.

LIU, H.-Y. et al. Maternal High-Fat Diet Controls Offspring Kidney Health and Disease. v. 15, n. 12, p. 2698, 2023. ISSN 2072-6643.

LUCAS, A. et al. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. v. 1, p. 1018-1020, 1978.

MI, J. et al. Effects of infant birthweight and maternal body mass index in pregnancy on components of the insulin resistance syndrome in China. **Ann Intern Med**, v. 132, n. 4, p. 253-60, Feb 15 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10681279 >.

MIRANDA, G. D. S. et al. Breastfeeding undernutrition changes iBAT-involved thermogenesis protein expression and leads to a lean phenotype in adult rat offspring. **J Nutr Biochem**, v. 99, p. 108857, Jan 2022. ISSN 1873-4847 (Electronic)

0955-2863 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34520852> >.

NELSON, D. P.; KIESOW, L. A. J. A. B. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). v. 49, n. 2, p. 474-478, 1972. ISSN 0003-2697.

OSMOND, C.; BARKER, D. J. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. **Environ Health Perspect**, v. 108 Suppl 3, p. 545-53, Jun 2000. Disponível em: < http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=10852853 >.

OUYANG, J. et al. GDF-15 as a weight watcher for diabetic and non-diabetic people treated with metformin. v. 11, p. 581839, 2020. ISSN 1664-2392.

PARRELA, J. et al. Intrauterine malnutrition disrupts leptin and ghrelin milk hormones, programming rats. **J Endocrinol**, v. 255, n. 1, p. 11-23, Oct 1 2022. ISSN 1479-6805 (Electronic)

0022-0795 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35904490> >.

PARRETTINI, S.; CAROLI, A.; TORLONE, E. J. F. I. E. Nutrition and metabolic adaptations in physiological and complicated pregnancy: focus on obesity and gestational diabetes. v. 11, p. 611929, 2020. ISSN 1664-2392.

RAMÍREZ-LÓPEZ, M. T. et al. The role of maternal diet in metabolic and behavioural programming: review of biologic mechanisms involved. v. 32, n. 6, p. 2433-2445, 2015. ISSN 0212-1611.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY, G. C., JR. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. **J Nutr**, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993. ISSN 0022-3166 (Print)

0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8229312> >.

RENA, G.; HARDIE, D. G.; PEARSON, E. R. J. D. The mechanisms of action of metformin. v. 60, n. 9, p. 1577-1585, 2017. ISSN 0012-186X.

RIANT, E. et al. Estrogens protect against high-fat diet-induced insulin resistance and glucose intolerance in mice. **Endocrinology**, v. 150, n. 5, p. 2109-17, May 2009. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19164473> >.

RÖDER, P. V. et al. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. v. 48, n. 3, p. e219-e219, 2016. ISSN 2092-6413.

ROSEBOOM, T. J. et al. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. **Mol Cell Endocrinol**, v. 185, n. 1-2, p. 93-8, Dec 20 2001. ISSN 0303-7207 (Print)

0303-7207 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738798> >.

RYZNAR, R. J. et al. Epigenetic modifications at the center of the barker hypothesis and their transgenerational implications. v. 18, n. 23, p. 12728, 2021. ISSN 1660-4601.

SALTIEL, A. R. J. T. J. O. C. I. Insulin signaling in health and disease. v. 131, n. 1, 2021. ISSN 0021-9738.

SEGOVIA, S. A. et al. Maternal obesity, inflammation, and developmental programming. **Biomed Res Int**, v. 2014, p. 418975, 2014. ISSN 2314-6141 (Electronic)

2314-6133 (Print). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967364> >.

STECULORUM, S. M. et al. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. **J Clin Invest**, v. 125, n. 2, p. 846-58, Feb 2015. ISSN 1558-8238 (Electronic)

0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25607843> >.

TIFFON, C. The Impact of Nutrition and Environmental Epigenetics on Human Health and Disease. **Int J Mol Sci**, v. 19, n. 11, Nov 1 2018. ISSN 1422-0067 (Electronic)

1422-0067 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30388784> >.

TOBI, E. W. et al. DNA methylation signatures link prenatal famine exposure to growth and metabolism. **Nat Commun**, v. 5, p. 5592, Nov 26 2014. ISSN 2041-1723 (Electronic)

2041-1723 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25424739> >.

TRAMUNT, B. et al. Sex differences in metabolic regulation and diabetes susceptibility. v. 63, p. 453-461, 2020. ISSN 0012-186X.

UAUY, R.; KAIN, J.; CORVALAN, C. J. T. A. J. O. C. N. How can the Developmental Origins of Health and Disease (DOHaD) hypothesis contribute to improving health in developing countries? , v. 94, n. suppl_6, p. 1759S-1764S, 2011. ISSN 0002-9165.

VAN ABELEN, A. F. et al. The fetal origins of hypertension: a systematic review and meta-analysis of the evidence from animal experiments of maternal undernutrition. **J Hypertens**, v. 30, n. 12, p. 2255-67, Dec 2012. ISSN 1473-5598 (Electronic)

0263-6352 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990358> >.

WAHLIG, J. L. et al. Impact of high-fat diet and obesity on energy balance and fuel utilization during the metabolic challenge of lactation. v. 20, n. 1, p. 65-75, 2012. ISSN 1930-7381.

WANDERLEY, E. N.; FERREIRA, V. A. [Obesity: a plural perspective]. **Cien Saude Colet**, v. 15, n. 1, p. 185-94, Jan 2010. ISSN 1678-4561 (Electronic)

1413-8123 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20169245> >.

WEAVER, I. C. et al. Epigenetic programming by maternal behavior. **Nat Neurosci**, v. 7, n. 8, p. 847-54, Aug 2004. ISSN 1097-6256 (Print)

1097-6256 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15220929> >.

XAVIER, E. O. Administração de metformina em água associada a clomifeno em ratos Wistar: avaliação de parâmetros de palatabilidade e bem-estar animal. 2022.

XAVIER, J. et al. Litter size reduction induces metabolic and histological adjustments in dams throughout lactation with early effects on offspring. v. 91, 2019.

YEREVANIAN, A.; SOUKAS, A. A. J. C. O. R. Metformin: mechanisms in human obesity and weight loss. v. 8, p. 156-164, 2019.

8. ARTIGO

High-caloric high-sucrose diet consumption by lactating mother programs infant rat's rapid catch-up growth as sex-specific effect

Aline Milena Dantas Rodrigues¹, Mateus Silva Campos¹, Ana Caroline Schoenberger Kipper¹, Antônio José Rocha Ribeiro¹, Manoela Fontenele Antunes¹, Luís Paulo Henriques Rodrigues da Silva¹, Isabelle Zanata Fabiane¹, Karoline Paiva da Silva¹, Ingridys Regina Borkenhagen¹, Ana Júlia Lopes Braga², Valéria Dornelles Gindri Senhorin², Paulo Cezar de Freitas Mathias³, Júlio Cezar de Oliveira¹

¹Research Group on Perinatal Programming of Metabolic Diseases: DOHaD paradigm, Laboratory of Metabolic and Cardiovascular Diseases, Health Education and Research Center (NUPADS), Institute of Health Sciences, ²Integrated Laboratory of Chemical Research (LiPEQ), Institute of Exact and Earth Sciences, Federal University of Mato Grosso, University *Campus* of Sinop, Sinop, MT, Brazil.

³Laboratory of Secretion Cell Biology, Department of Biotechnology, Genetics and Cell Biology, State University of Maringá, Maringá, PR, Brazil.

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

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

Short title: Early hyperphagia association with milk glucose and fat.

Word count: 4,097

Reference count: 43

Figure and table count: 8

Abstract

Herein, we aimed to access maternal metabolic dyshomeostasis associated to high-caloric high-sucrose diet consumption during lactation, and its correlation with milk composition, and body weight gain and milk intake in infant male and female rat-offspring. At delivery, mothers were fed a high-caloric high-sucrose diet (Obese-mother) throughout lactation, while control fed a standard diet (Control-mother). Litter size was adjusted to eight pups (four male and four female) per mother, and rats were weaned at 22 days old. Milk, blood and body tissues from mothers were collected to biochemical and biometrical analyses, as well as the rat-offspring's body weight gain and milk intake were assessed. At the end of nursing period, Obese-mothers displayed body weight, adiposity index and liver weight higher than Control-mothers; as well as even though were normoglycemic, presented liver dysfunction, smaller HDL-cholesterol and hypertriglyceridemia that was associated with slightly insulin resistant. At day 12th, milk from Obese-mother was richer in energy content, glucose, total cholesterol and triglycerides, but poor in total proteins. Regarding rat-offspring from Obese-mother (O-Offspring), independent of the sex, they presented milk hyperphagia and rapid catch-up growth during suckling period and were heavier than C-Offspring. In addition, the catch-up growth was more prominent and earliest started in male than female O-Offspring, as well as more strongly correlated with the milk glucose, cholesterol and fat content. In summary, maternal high-caloric high-sucrose consumption, during suckling phase, beside alters maternal metabolism, body adiposity and milk composition, influences rat-offspring, as a sex-dependent way, to earliest trigger the onset of obesity.

Keywords: suckling phase, catch-up growth, milk composition, infant obesity

Introduction

The rising in overweight and obesity into children and adolescents aged 5–19 years has become a worrying worldwide problem. Today, the prevalence of overweight (including obesity) among children and adolescents aged 5–19 has risen dramatically from just 8% to 20% in the last three decades [1].

Among several factors, like those environmental chemical exposures influencing the developmental origin of health and disease (DOHaD), which has contributed for the DOHaD concept, over the years [2], nutritional insults in early life have been highlighted by seminal epidemiological, clinical and preclinical studies [3-5] as one of the many factors underling the origin of metabolic dysfunctions, as long-term consequence. On this field, consumption of hypercaloric diet has been associated to cardiometabolic diseases; both when ingested in adulthood, directly by the individuals exposed to the diet effect [6] and in early life, indirectly by maternal ingestion of nutritionally unbalanced diet, during critical periods when their offspring's neuroendocrine circuitry is developing [7, 8].

The suckling period is an important neuroendocrine plasticity time-point, where individuals are in a critical plasticity process that is sensitive to different types of stress. It makes the components in the milk, the exclusive nutritional source for developing babies, which can program babies/pups for a metabolic healthy or ill status [9]. Changes in circulating nutrients and hormones, in mothers presenting obesity condition, might be passing for breastfeeding babies, which can cause physiological perturbations in neuroendocrine babies in early development [10, 11].

Scientific evidence reporting effects of maternal nutritional insults, such as calorie restriction, consumption of obesogenic diets and maternal obesity, impairing milk composition have been highlighted in literature [12], and it can affect the offspring's energy and metabolism homeostasis as long-term consequences. In addition, known that sex-dependent long-lasting effects are commonly find in the offspring whose mothers underwent different nutritional insults during critical periods [13-15], we hypothesised that the ingestion of hypercaloric and sucrose-added diet, by nursing mothers, changing maternal adiposity can affects milk composition programming the milk eating behavior in breastfeeding rat-offspring, which may be underlining the origin of the metabolic dysfunction commonly observed in offspring as long-term consequence [16]. Therefore, to better understand this interplay, herein we were interested in accessing maternal metabolic dyshomeostasis in lactating rat-mothers fed a high-caloric high-sucrose diet, as well as assessing milk composition and body weight gain and milk intake in infant male and female rat-offspring.

Material and methods

Ethical approval

The protocols were approved by the Ethics Committee for the Animal Use and Experiments of the Federal University of Mato Grosso (CEUA/UFMT; process number 23108.724433/2017-16), which adheres to the Brazilian Federal Law number 11.794/2008. Our study complies with the animal ethics checklist as described by [17].

Experimental design and diet treatment

All the rats were maintained under controlled conditions of temperature ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$), humidity ($55\pm 5\%$) and lighting (12 hours light cycle with light on: 06:00 AM–06:00 PM), throughout the experimental period with water and rodent chow *ad libitum* (Nuvital®, Curitiba, PR, Brazil).

Virgin, female, 70-day-old Wistar rats were mated with proven male breeders ($n = 8$). At birth, the number of male and female, the birthweight and naso-anus length of rat-offspring were recorded, and then the litter size adjusted to eight pups (four male and four female) per lactating mother and only litters containing at least four male and four female pups were used in the study.

While the control dams (Control, $n=8$) were fed a rodent chow *ad libitum* (Nuvital®, Curitiba, PR, Brazil) that contains (3,860 kcal/kg, Table 1) throughout gestation and lactation; the obesity-induced mothers (Obese, $n=8$) were fed a high-caloric diet (4,589 kcal/kg, Table 1) and a high-sucrose solution (10% of sucrose drinking-solution) from delivery until weaning. At each two days, the mothers body weight, food intake and the ingestion of drinking water and sucrose-solution were assessed throughout the period of lactation.

As previously reported [18] and showed in table 1, the hypercaloric diet was manufactured in our lab, by mixing powdered standard rodent rat chow (400 g) with casein (50 g), soybean oil (100 g), condensed milk (150 g), pork fat (50 g), cornstarch (100 g) and sucrose (150 g), and the mineral (10.925 g) and vitamin (0.357 g) mixtures were added according to the American Institute of Nutrition (AIN93) recommendations [19]. In addition, a drinking sucrose-solution at 10% was offer to mothers throughout lactation in an individual bottle.

Mothers blood collection and body composition assessment

After weaning, all dams were fasted overnight and euthanized by decapitation. Next, blood, liver and the white adipose tissue representative of the visceral (periovarian, retroperitoneal and mesenteric) stores, as well as the lean mass representative of the skeletal (soleus and extensor digitorum longus, EDL) muscle were removed and weighed.

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

Blood samples were centrifuged (10 minutes at 1,248 g) and plasma stored at -20°C for subsequent biochemical analyzes.

Milk sample collection

The milk collection was performed at 12th day of lactation, where mothers were separated from their pups by 2 hours. After that, dams were anesthetized (ketamine-xylazine, 80mg plus 6mg/kg bw, i.p.), and to stimulate milk ejection, received an injection (2.5IU/kg bw, i.p.) of synthetic oxytocin (Oxytocin[®], Chemical Union, Embu, São Paulo, SP, Brazil). A volume of 500 μL milk was collected in a sterile Pasteur pipette by manually massaging the nipple [20]. Milk samples were stored at -80°C for subsequent biochemical analyses.

Milk composition assessment

Regarding milk composition, after collection the milk samples were stored at -20°C for subsequent calcium (Ca^{2+}), total proteins, glucose, triglyceride and total cholesterol evaluation using commercial kits (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brazil) through spectrophotometry.

The milk energy content was quantified by the creatocrit technique, as previously reported [21, 22]. For this, a volume of 75 μL of milk was analyzed by creatocrit technique, in which the milk percentage fat content, as well as milk energy (kcal/L) were calculated.

Plasma biochemical assessment

After blood collection, in heparinized tubes, it was centrifuged for 10 minutes at 1,248 g, and plasma samples were stored at -20°C for subsequent glucose, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL) cholesterol, triglyceride, total proteins, aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) evaluation using commercial kits (Gold Analisa, Belo Horizonte, MG, Brazil) through spectrophotometry. The very low-density lipoprotein (VLDL) cholesterol was quantified by Friedewald calculations, where $\text{VLDL cholesterol} = \text{fasting triglycerides}/5$ [23, 24].

Considering that TyG index is widely used by clinicians to identify insulin resistance in apparently healthy individuals [25], the values of TyG index were calculated to predict the body

insulin sensitivity in mothers. For this, it was performed the follow calculation: TyG index = $\text{Ln} [(\text{Fasting glycemia}_{(\text{mg/dL})}) \times (\text{Fasting triglycerides}_{(\text{mg/dL})})/2]$.

Rat-offspring body weight gain from birth until weaning and milk ingestion

The body weight gain of rat-offspring was recorded every two days, from birth until 22 days of age, when weaning was performed.

The milk ingestion by rat-offspring was performed as previously described [26], where at 6th, 11th and 16th days of lactation, rat-offspring were fasted by 4 hours, by separation from their respective mothers. After that, rats were weighed and returned to the cages to suckling per a period of 1 hour.

The difference between rat's weight after- and before-suckling time-point was considered as the amount of milk ingested (per grams) by each one of rats. The values of milk ingested was related with the percentage of the rats' body weight, considering the body weight obtained after the suckling period, as follow: $\text{milk ingestion} = [(\text{rat's body weight}_{(\text{after-suckling})}) - (\text{rat's body weight}_{(\text{before-suckling})}) / \text{rat's body weight}_{(\text{after-suckling})} \times 100]$.

Liver oxidative stress assessment

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

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

The levels of protein carbonylation were determined by spectrophotometry after 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) derivatization [27] with some modifications, where the content of carbonyl was calculated using a molar extinction coefficient of 22,000 per M per cm and is expressed as nmol carbonyls/mg protein.

To assess the CAT enzymatic activity was performed by the decomposition of H₂O₂ technique, which is expressed in $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg protein}^{-1}$ [28], where the protein quantification was performed by the Coomassie blue method using bovine serum albumin as a standard, measuring the absorbance at 595 nm.

Statistical analyses

The results are given as the mean $\pm$ the SEM and were subjected to the Shapiro-Wilk normality test. Data that assumed Gaussian distribution were subjected to the parametric tests [Student's t-

test or one way analyse of variance (one-way ANOVA), followed by the Tukey's multiple comparisons test]. For data that did not assume Gaussian distribution, it was used nonparametric Mann-Whitney's test.

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

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

Results

Maternal energy consumption and body composition status during lactation

During the period of lactation, the global energy consumption by Obese-mother was 32.92% higher than Control-mother ($P<0.001$, Figure 1A-B).

Regarding to the global hydric ingestion, it was not different between Obese-mother *versus* Control-mother ($P=0.056$, *data not showed*), whereas Obese-mother preferred to drink sucrose solution by 2-fold than to drink drinking-water ($P<0.001$, Figure 1C-D). However, comparing the intake of drinking-water by Obese-mother *versus* Control-mother, it was reduced by 2.5-fold in Obese-mother ($P<0.001$, Figure 1C-D); while the sucrose solution intake by Obese-mother did not differ from drinking-water intake by Control-mother ($P=0.053$, Figure 1C-D).

The maternal body weight gain throughout the lactation did not differ between groups ($P=0.721$, Figure 1E-F).

At the end of lactation, the Obese-mother displays an obese phenotype, where increased values were observed to body weight (11.58%, $P<0.01$, Figure 1G) and adiposity index (2-fold, $P<0.001$, Figure 1H), without difference for the lean mass index ($P=0.778$, Figure 1I).

Maternal biochemical analysis at the end of lactation

At the end of nursing period, in comparison with Control-mother, the Obese-mother were normoglycemic ($P=0.591$, Figure 2A), nonetheless displayed levels of triglycerides increased by 38.4% ($P<0.01$, Figure 2B) and the value of TyG index increased by 5.79% ($P<0.01$, Figure 2C). On the other hand, there were no statistical differences between groups regarding values of total cholesterol ($P=0.591$, Figure 2D) and VLDL cholesterol ($P=0.591$, Figure 2D), while the HDL cholesterol was reduced by 53.75% ($P<0.01$, Figure 2F).

Assessment of maternal liver function

On this regard, when compared to Control group, the relative weight of liver was increased by 27.03% ($P<0.01$, Figure 3A), the plasma total proteins level was reduced by 16% ($P<0.05$, Figure 3B), while the enzymatic plasma levels of AST were increased by 38.37% ($P<0.01$, Figure 3C) and ALT by 61.54% ($P<0.05$, Figure 3D).

Regarding the redox status in the liver, the Obese-mother displayed increased levels of TBARS, 165.45% higher than Control-mothers ($P<0.01$, Figure 3E), and carbonil that was augmented by 20.62% in compaction do Control-mothers ($P<0.05$, Figure 3F). As well as the liver CAT was 24.25% higher than in Control-mothers ($P<0.05$, Figure 3G).

Breast milk composition

The figure 4 shows milk content obtained at 12th of lactation. In comparison with Control-mother group, milk from Obese-mother did not differ in the Ca²⁺ concentration (Figure 4A); while was reduced by 18.14% in the total protein levels ($P<0.001$) and displayed increased levels of glucose (+17.12%, $P<0.05$), total cholesterol (+23.94%, $P<0.05$), triglycerides (+32.17%, $P<0.001$), fat content (+96.96%, $P<0.01$) and the content of energy (+50.95%, $P<0.01$).

Assessment of newborn rat-offspring body weight and milk intake

As expected, there were no statistical differences in birthweight of rat-offspring, neither between groups nor between sex (male C-Offspring: 6.197 ± 0.131 , $n=32$; male O-Offspring: 6.341 ± 0.151 , $n=32$; female C-Offspring: 6.019 ± 0.167 , $n=32$; female O-Offspring: 5.898 ± 0.143 , $n=32$, $P>0.05$, Figure 5A-B).

In male sex, in comparison to C-Offspring, the body weight of O-Offspring was higher from the age eight days-old until weaning ($P<0.001$, Figure 5A-D); while in female sex, when related to C-Offspring, the body weight of O-Offspring was higher just in the age sixteen ($P<0.05$, Figure 5B), which was maintained until weaning ($P<0.01$, Figure 5B-D).

Comparing male *versus* female C-Offspring's body weight gain, throughout suckling phase and at weaning, it did not differ between groups ($P>0.05$, Figure 5C-D). On the other hand, during the same period of lactation, the body weight gain of male O-Offspring *versus* female O-Offspring was increased by 11.84% ($P<0.001$, Figure 5C) and the body weight at weaning was 10.17% higher in male O-Offspring than in female ones ($P<0.001$, Figure 5D).

Regarding the milk consumption by pups at 6th day of age, the O-Offspring male rats consumed 83.33% more milk than C-Offspring male rats ($P<0.001$, Figure 5E) and O-Offspring female rats ingested 51.10% more than C-Offspring female rats ($P<0.01$, Figure 5E). While milk intake by C-Offspring male rats, at this age, did not differ from C-Offspring female rats ($P=0.952$, Figure 5E), it was 32.06% higher in O-Offspring male rats than in O-Offspring female rats ($P<0.05$, Figure 5E).

At the age 11th days-old, the milk intake by O-Offspring male rats was 62.01% higher than C-Offspring male rats ($P<0.001$, Figure 5E). In turn of female sex, the milk ingestion by O-Offspring was 31.23% higher than C-Offspring ($P<0.05$, Figure 5E). The milk consumption by C-Offspring male rats did not differ from C-Offspring female rats ($P=0.999$, Figure 5E); by other hand, it was 25.40% higher in O-Offspring male rats than O-Offspring female rats ($P<0.05$, Figure 5E).

At the age 16th days-old, the milk intake was 39.49% higher in O-Offspring male rats than in C-Offspring male rats and 42.71% higher in O-Offspring female rats than in C-Offspring female rats ($P<0.01$, Figure 5E). The milk consumption by C-Offspring male did not differ from C-

Offspring female rats ($P=0.893$, Figure 5E), as well as it was not different between O-Offspring male and O-Offspring female rats ($P=0.895$, Figure 5E).

Assessment of newborn rat-offspring's body weight gain versus maternal adiposity, breast milk content of energy and fat

As showed in the figure 6, the body weight gain of male rat-offspring was positive and strongly correlated to maternal adiposity ($r = 0.708$, $P<0.01$, Figure 6A), to breast milk energy content ($r = 0.669$, $P<0.001$, Figure 6B) and to breast milk fat content ($r = 0.828$, $P<0.001$, Figure 6C). On the other hand, the Pearson's correlation in female rat-offspring, showed a slightly moderated correlation with maternal adiposity ($r = 0.430$, $P>0.05$, Figure 6A), with breastmilk energy content ($r = 0.339$, $P>0.05$, Figure 6B) and with breastmilk fat content ($r = 0.518$, $P>0.05$, Figure 6C).

Assessment of newborn rat-offspring's body weight versus breast milk intake during lactation and breast milk intake at 11th days old versus breast milk composition

As showed in the figure 7, the Pearson's correlation of rat-offspring's body weight *versus* milk intake was not statistical different in most of the analyses. It was observed, a moderate positive correlation only in male C-Offspring at 6th days old ($r = 0.460$, $P<0.05$, Figure 7A) and in female C-Offspring at 11th days old ($r = 0.446$, $P<0.05$, Figure 7B).

Assessing the Pearson's correlation of rat-offspring's milk intake at 11th days old *versus* milk composition, it was observed that while C-Offspring male and female rats did not show significant correlation, the male O-Offspring group display a strong positive correlation between milk feed-behavior *versus* milk total proteins ($r = 0.723$, $P<0.05$, Figure 7D), glucose ($r = 0.823$, $P<0.05$, Figure 7E), total cholesterol ($r = 0.959$, $P<0.001$, Figure 7G) and fat content ($r = 0.719$, $P<0.05$, Figure 7H), with a moderate, but not statistically different correlation with milk energy ($r = 0.480$, $P>0.05$, Figure 7I).

Regarding this, in female O-Offspring group a strong, but negative correlation between milk feed-behavior *versus* milk total cholesterol ($r = - 0.965$, $P<0.001$, Figure 7G) and fat content ($r = - 0.767$, $P<0.05$, Figure 7H) was find.

Discussion

In the present study we evidence the negative effect of a hypercaloric and sucrose-enriched diet ingestion by lactating mothers on the milk composition, and on the milk feed-behavior and catch-up growth of breastfeeding male and female infant rat-offspring. Yet, showing, by the first time, until we know, a positive and relatively strong correlation among milk lipids (total-cholesterol triglycerides, fat content) and milk glucose content and the pup's milk hyperphagia, which must be contributing for the fast catch-up growth observed in infant male rat-offspring.

The consumption of a high-caloric high-sucrose diet, per three weeks, by nursing mothers was able to modulate maternal metabolism for an obese phenotype, where the homeostasis of lipid profile and liver function were broken, which were associated to unbalance redox status. These finds corroborate previous studies, in which an obesogenic diet negatively affects maternal body composition and metabolism [29], as well as the liver function [30]. In regarding liver function, differently of the data previously reported by Bautista and colleagues in which mothers were fed an obesogenic diet throughout life, including pregnancy and lactation, where the authors discuss about negative effects of obesogenic diet consumption on affecting maternal mammary gland and liver function that changes milk composition, suggesting an interplay between mammary gland and liver in regarding lipid metabolism during lactation [30]. In this regard, due to ingestion of high-fat diet by lactating mothers, it triggers lipid metabolism, addressing fatty acids transportation to the mammary gland contributing for changing in the milk composition, for instance increasing triglycerides in milk [31]. In line, in our study, we find that changes in liver function (especially hepatomegaly, high AST, high ALT and the unbalance liver redox status) observed in the Obese-mothers depicts an injury resulting from high-caloric and high-sucrose diet ingestion in a short period (only in the three weeks of lactating period), which must be influencing the changes in milk composition, as well as it was previously reported in a similar obesogenic diet offer to dams only during the lactation [29].

The association between milk composition and maternal obesity induced by high-fat diet in different stages of rat-offspring development have been showed. In fact, the effect of high-fat diet consumption only during the nursing period on maternal body composition and metabolism is not a newness, as well as its association with the long-term consequence on the rat-offspring [29]. Even though it is not yet clear what is the effect on the rat-offspring in early stages of life development, and how it appears on the different sex in developing rat-offspring. Although some contribution for the understanding about the effect of maternal obesity due to high-fat diet consumption on the milk composition and/or on the rat-offspring ingestive behavior had been put out in the literature, the authors had studied the high-fat diet effects throughout pregnancy and lactation [32, 33].

In the present study, since early lactation (at sixth day of age) forward, both male and female O-Offspring rats presented hyperphagia on milk intake. Even though it was highest in male than in female rats, with an increment of 32% at sixth day-old and 25% at eleventh day-old than female. As well, O-Offspring rats presented higher body weight gain than its counterparts; besides, male O-Offspring rats display a fastest body weight gain. Meanwhile it started at eighth day-old in male O-Offspring; in female O-Offspring rats, it began only at sixteenth day-old, with a smaller magnitude. It brings in light the knowledge about the rapid infant growth, which is put out as one of the early risk factors underlining childhood obesity [34, 35] that is a strong predictor for the early onset of metabolic derangements that highlights a link between rapid catch-up group in early life and the risk for development of metabolic diseases associated with energy controlling pathways modulation early in life [10].

Given that, in the present study, milk consumed by O-Offspring rats was hypercaloric, including high levels of energetic nutrients (fat, glucose, triglycerides and total cholesterol); altogether, it is a suggestive factor for a greedier milk feed-behavior. In fact, nutritional alterations in the diet of nursing mother can modulate the breast milk composition (e.g. the augmentation of fat content and leptin levels in milk from mother fed a high-fat diet), influencing infant development for an unhealthy status, including cardiometabolic dysfunctions [9]. In this regards, even though we did not have measured metabolic hormones in the present study (especially leptin, insulin and ghrelin), it is necessary to highlight that these hormones are critical on regulating and establishing neuroendocrine connections as growth factors, promoting stability and maturation of the several pathways involved in energy metabolism regulation [36-38].

Although the role of metabolic hormones via breast milk should not be ruled out on this filed [9, 11, 12, 39]; and yet, considering the role of high fat diet on increasing circulating levels lipids, likewise the linoleic acid, that increases the availability to the mammary gland and transfer to milk and to the neonate [31, 40]; in the present study we emphasize the role of the milk macronutrients, since when the Pearson's correlations were performed to assess maternal adiposity, milk energy and fat content with weaned O-Offspring rats' body weight it presented a significantly more prominent strong and positive correlation in male, but not in female rat-offspring, as well it did not display significant difference between O-Offspring *versus* C-Offspring neither between male *versus* female in regard to pup's body weight correlated to milk feed-behavior in each assessed age.

In fact, the present study provides the first evidence that newborn rat offspring nursed by mothers exposed to high-caloric high-sucrose diet, only during lactation, increases milk feed-behavior directly associated to the energy content of the breast milk, which in male rats is directly correlated to the glucose and total cholesterol content in milk. By specifying the Pearson's

correlation seeking for association between milk feed-behavior and milk nutrients at 11th days old, our finding show a significantly strong and positive correlation in male, but not in female O-Offspring between the content of total cholesterol, total proteins and glucose, while the fat content in milk was showed to be strong and positive correlated with milk feed-behavior in both of male and female sexes. This find associated to rapid body weight gain is an early risk factors that can trigger the onset of childhood obesity, corroborating evidence in which rat-offspring nursed by mothers fed a high fat diet throughout pregnancy and lactation increases the milk intake that is associated to a rapid seeking for and an increased caloric intake during independent feeding [33].

In regarding sex difference on rapid weight gain, milk intake and on its correlation with milk glucose and cholesterol levels in O-Offspring pups, we do not have a tangible explanation, that constitute one of the fragilities in the current study. It is known that sexual hormones influences brain ontogeny development [41], as well evidence reporting some differences in the milk production to male and female cow-offspring have been reported, in which the capacity of the mammary gland on producing milk during suckling period is influenced by the sex of the fetus, and it programs high milk production for female than for male cow-offspring [42]. Although, this evidence links sex differences to milk availability, it does not support any explanation for our data, once male and female O-Offspring were suckling the same milk, at the same time and in the same mother.

In another study, authors evidence that male rat-offspring from mother fed a high fat diet during pregnancy, have increased histone acetylation and androgen receptor binding to promoter of the cannabinoid receptor 1 (*Cnr1*) gene in the hypothalamus, which was showed to be associated to sex-specific epigenetic changes affecting metabolism of rat-offspring [43]. On this view, it is important to have in mind that consumption and provision of inappropriate foods, such as high-caloric high-sucrose diets, exceeding the ideal nutritional guidelines contributes to the fast increase in metabolic diseases, worldwide.

In summary, rat-offspring from mothers exposed to high-caloric high-sucrose diet, only during suckling period, displays early milk hyperphagia and a rapid body weight gain, which is more prominent in male than female neonate. In addition, these earliest obese phenotype is directly associated to the energy and nutrients, like glucose and fat, greatly supplied in milk from mothers fed a high-caloric high-sucrose diet.

Funding

This work was supported by the Brazilian Federal Research Foundation Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Master student fellowship, 88887.840730/2023-00).

Author Declarations

The authors declare that there no conflict of interest.

Author Contributions

AMDR and JCO designed the study; AMDR, PCFM and JCO revised the manuscript; AMDR, MSC, ACSR, AJRR, MFA, LPHRS, IZF, KPS, IRB, AJLB and conducted the research; AMDR, VDGS, PCFM and JCO analyzed the data; JCO and AMDR wrote the manuscript; JCO acted as the principal investigator, provided support and reviewed the data and manuscript.

References

1. WHO (2024) Obesity and overweight. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Accessed 20 Juny 2024.
2. Haugen AC, Schug TT, Collman G, Heindel JJ. Evolution of DOHaD: the impact of environmental health sciences. *J Dev Orig Health Dis.* 2015;6(2):55-64. doi: 10.1017/S2040174414000580.
3. Hasebe K, Kendig MD, Morris MJ. Mechanisms Underlying the Cognitive and Behavioural Effects of Maternal Obesity. *Nutrients.* 2021;13(1). doi: 10.3390/nu13010240.
4. Chooi YC, Ding C, Magkos F. The epidemiology of obesity. *Metabolism: clinical and experimental.* 2019;92:6-10. doi: 10.1016/j.metabol.2018.09.005.
5. Ribeiro TA, Pavanello A, Tofolo LP, de Oliveira JC, Moraes AMP, Franco C, et al. Soy isoflavones recover pancreatic islet function and prevent metabolic dysfunction in male rats. *J Endocrinol.* 2021;250(3):81-91. doi: 10.1530/JOE-21-0019.
6. Melo BF, Sacramento JF, Capucho AM, Sampaio-Pires D, Prego CS, Conde SV. Long-Term Hypercaloric Diet Consumption Exacerbates Age-Induced Dysmetabolism and Carotid Body Dysfunction: Beneficial Effects of CSN Denervation. *Front Physiol.* 2022;13:889660. doi: 10.3389/fphys.2022.889660.
7. Palazzo RP, Torres ILS, Grefenhagen AI, da Silva BB, de Meireles LCF, de Vargas KC, et al. Early life exposure to hypercaloric diet impairs eating behavior during weaning: The role of BDNF signaling and astrocyte marks. *Int J Dev Neurosci.* 2020;80(7):667-78. doi: 10.1002/jdn.10063.
8. Wright TM, Fone KC, Langley-Evans SC, Voigt JP. Exposure to maternal consumption of cafeteria diet during the lactation period programmes feeding behaviour in the rat. *Int J Dev Neurosci.* 2011;29(8):785-93. doi: 10.1016/j.ijdevneu.2011.09.007.
9. Lisboa PC, Miranda RA, Souza LL, Moura EG. Can breastfeeding affect the rest of our life? *Neuropharmacology.* 2021;200:108821. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108821.
10. Ross MG, Desai M. Developmental programming of appetite/satiety. *Annals of nutrition & metabolism.* 2014;64 Suppl 1:36-44. doi: 10.1159/000360508.
11. Badillo-Suarez PA, Rodriguez-Cruz M, Nieves-Morales X. Impact of Metabolic Hormones Secreted in Human Breast Milk on Nutritional Programming in Childhood Obesity. *Journal of mammary gland biology and neoplasia.* 2017;22(3):171-91. doi: 10.1007/s10911-017-9382-y.
12. Pico C, Reis F, Egas C, Mathias P, Matafome P. Lactation as a programming window for metabolic syndrome. *Eur J Clin Invest.* 2021;51(5):e13482. doi: 10.1111/eci.13482.
13. Rodriguez-Gonzalez GL, Reyes-Castro LA, Bautista CJ, Beltran AA, Ibanez CA, Vega CC, et al. Maternal obesity accelerates rat offspring metabolic ageing in a sex-dependent manner. *The Journal of physiology.* 2019;597(23):5549-63. doi: 10.1113/JP278232.
14. Zambrano E, Martinez-Samayoa PM, Bautista CJ, Deas M, Guillen L, Rodriguez-Gonzalez GL, et al. Sex differences in transgenerational alterations of growth and metabolism in progeny (F2) of female offspring (F1) of rats fed a low protein diet during pregnancy and lactation. *J Physiol.* 2005;566(Pt 1):225-36. doi: 10.1113/jphysiol.2005.086462.
15. Park S, Belfoul AM, Rastelli M, Jang A, Monnoye M, Bae H, et al. Maternal low-calorie sweetener consumption rewires hypothalamic melanocortin circuits via a gut microbial co-metabolite pathway. *JCI Insight.* 2023;8(10). doi: 10.1172/jci.insight.156397.

16. Apolinario LF, Silva AT, Rosa AP, Oliveira CDS, Lira C, Guerra J, et al. Supplementation of the maternal diet with Brazil nut (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) prevents cognitive impairment in the offspring of obese mothers. *J Dev Orig Health Dis.* 2023;14(6):795-804. doi: 10.1017/S2040174424000023.
17. Grundy D. Principles and standards for reporting animal experiments in *The Journal of Physiology and Experimental Physiology*. *The Journal of physiology.* 2015;593(12):2547-9. doi: 10.1113/JP270818.
18. Miranda GDS, de Lima TAL, Costermani HO, Ricken C, Parrela J, Membrive BLA, et al. Breastfeeding undernutrition changes iBAT-involved thermogenesis protein expression and leads to a lean phenotype in adult rat offspring. *The Journal of nutritional biochemistry.* 2022;99:108857. doi: 10.1016/j.jnutbio.2021.108857.
19. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC, Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *The Journal of nutrition.* 1993;123(11):1939-51.
20. Miranda RA, da Silva Franco CC, de Oliveira JC, Barella LF, Tofolo LP, Ribeiro TA, et al. Cross-fostering reduces obesity induced by early exposure to monosodium glutamate in male rats. *Endocrine.* 2017;55(1):101-12. doi: 10.1007/s12020-016-0965-y.
21. Lucas A, Gibbs JA, Lyster RL, Baum JD. Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *British medical journal.* 1978;1(6119):1018-20. doi: 10.1136/bmj.1.6119.1018.
22. Xavier JLP, Scomparin DX, Pontes CC, Ribeiro PR, Cordeiro MM, Marcondes JA, et al. Litter Size Reduction Induces Metabolic and Histological Adjustments in Dams throughout Lactation with Early Effects on Offspring. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias.* 2019;91(1):e20170971. doi: 10.1590/0001-3765201920170971.
23. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clinical chemistry.* 1972;18(6):499-502.
24. Martin SS, Giugliano RP, Murphy SA, Wasserman SM, Stein EA, Ceska R, et al. Comparison of Low-Density Lipoprotein Cholesterol Assessment by Martin/Hopkins Estimation, Friedewald Estimation, and Preparative Ultracentrifugation: Insights From the FOURIER Trial. *JAMA cardiology.* 2018;3(8):749-53. doi: 10.1001/jamacardio.2018.1533.
25. Simental-Mendia LE, Rodriguez-Moran M, Guerrero-Romero F. The product of fasting glucose and triglycerides as surrogate for identifying insulin resistance in apparently healthy subjects. *Metabolic syndrome and related disorders.* 2008;6(4):299-304. doi: 10.1089/met.2008.0034.
26. Parrela J, Borkenhagen IR, Salmeron SRF, Lima TAL, Miranda GDS, Costermani HO, et al. Intrauterine malnutrition disrupts leptin and ghrelin milk hormones, programming rats. *J Endocrinol.* 2022;255(1):11-23. doi: 10.1530/JOE-21-0427.
27. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, et al. A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2016;1019:178-90. doi: 10.1016/j.jchromb.2015.11.052.
28. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Anal Biochem.* 1972;49(2):474-8. doi: 10.1016/0003-2697(72)90451-4.

29. Gomes RM, Bueno FG, Schamber CR, de Mello JCP, de Oliveira JC, Francisco FA, et al. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2018;61:24-32. doi: 10.1016/j.jnutbio.2018.07.006.
30. Bautista CJ, Montano S, Ramirez V, Morales A, Nathanielsz PW, Bobadilla NA, et al. Changes in milk composition in obese rats consuming a high-fat diet. *Br J Nutr*. 2016;115(3):538-46. doi: 10.1017/S0007114515004547.
31. Suarez-Trujillo A, Huff K, Ramires Ferreira C, Paschoal Sobreira TJ, Buhman KK, Casey T. High-fat-diet induced obesity increases the proportion of linoleic acyl residues in dam serum and milk and in suckling neonate circulation. *Biol Reprod*. 2020;103(4):736-49. doi: 10.1093/biolre/ioaa103.
32. Purcell RH, Sun B, Pass LL, Power ML, Moran TH, Tamashiro KL. Maternal stress and high-fat diet effect on maternal behavior, milk composition, and pup ingestive behavior. *Physiol Behav*. 2011;104(3):474-9. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.05.012.
33. Kojima S, Catavero C, Rinaman L. Maternal high-fat diet increases independent feeding in pre-weanling rat pups. *Physiol Behav*. 2016;157:237-45. doi: 10.1016/j.physbeh.2016.02.010.
34. Larque E, Labayen I, Flodmark CE, Lissau I, Czernin S, Moreno LA, et al. From conception to infancy - early risk factors for childhood obesity. *Nat Rev Endocrinol*. 2019;15(8):456-78. doi: 10.1038/s41574-019-0219-1.
35. Ong KK. Catch-up growth in small for gestational age babies: good or bad? *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2007;14(1):30-4. doi: 10.1097/MED.0b013e328013da6c.
36. Croizier S, Prevot V, Bouret SG. Leptin Controls Parasympathetic Wiring of the Pancreas during Embryonic Life. *Cell reports*. 2016;15(1):36-44. doi: 10.1016/j.celrep.2016.02.088.
37. Steculorum SM, Collden G, Coupe B, Croizier S, Lockie S, Andrews ZB, et al. Neonatal ghrelin programs development of hypothalamic feeding circuits. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):846-58. doi: 10.1172/JCI73688.
38. Bouret SG, Simerly RB. Development of leptin-sensitive circuits. *J Neuroendocrinol*. 2007;19(8):575-82. doi: 10.1111/j.1365-2826.2007.01563.x.
39. Palou M, Pico C, Palou A. Leptin as a breast milk component for the prevention of obesity. *Nutrition reviews*. 2018;76(12):875-92. doi: 10.1093/nutrit/nuy046.
40. Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, Estadella D, Oyama LM, Oller do Nascimento CM, et al. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J Nutr Biochem*. 2015;26(2):99-111. doi: 10.1016/j.jnutbio.2014.10.001.
41. Lustig RH, Hua P, Wilson MC, Federoff HJ. Ontogeny, sex dimorphism, and neonatal sex hormone determination of synapse-associated messenger RNAs in rat brain. *Brain Res Mol Brain Res*. 1993;20(1-2):101-10. doi: 10.1016/0169-328x(93)90114-5.
42. Hinde K, Carpenter AJ, Clay JS, Bradford BJ. Holsteins favor heifers, not bulls: biased milk production programmed during pregnancy as a function of fetal sex. *PLoS One*. 2014;9(2):e86169. doi: 10.1371/journal.pone.0086169.
43. Almeida MM, Dias-Rocha CP, Reis-Gomes CF, Wang H, Atella GC, Cordeiro A, et al. Maternal high-fat diet impairs leptin signaling and up-regulates type-1 cannabinoid receptor with sex-specific epigenetic changes in the hypothalamus of newborn rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;103:306-15. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.02.004.

Figure legends

Figure 1. Caloric (A-B) and hydric (C-D) consumption and body weight gain (E-F) from mothers during the period of lactation and body composition (G-I) at the end of lactation. Data are presented as mean $\pm$ SEM of 8 mothers for each group. The statistical analyses between groups were obtained by one-way ANOVA, followed by Tukey's (D), Student's t (G, H and I) and Mann-Whitney's (B and F) tests, where $**P<0.01$, $***P<0.001$. The figures B, D and F represent the area under the curve (AUC) of figures A, C and E, respectively.

Figure 2. Blood biochemical parameters of mothers. Data are presented as mean $\pm$ SEM of 12 hours fasted mothers (n=8 mothers per group). The statistical analyses between groups for plasma glucose (A), triglycerides (B), TyG index (C), total cholesterol (D), VLDL cholesterol (E) and (F) HDL cholesterol total proteins (F) were obtained by Student's t test, where $*P<0.05$, $**P<0.01$.

Figure 3. Liver function and redox status of mothers. Data are presented as mean $\pm$ SEM of 12 hours fasted mothers (n=8 mothers per group). The statistical analyses between groups for liver weight (A), plasma total proteins (B), AST (C) and ALT (D), and liver redox biomarker carbonil (F) were obtained by Student's t test and for TBARS (E) and CAT (G) liver redox biomarkers were obtained by Mann-Whitney's test, where $*P<0.05$, $**P<0.01$.

Figure 4. Breast milk composition at 12th day of lactation. Data are presented as mean $\pm$ SEM of 8 mothers per group. The statistical analyses between groups were obtained by Student's t test, where $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$.

Figure 5. Rat-offspring's body weight gain throughout suckling period (A-C), body weight at weaning (D) and milk intake during lactation (E). Data are presented as mean $\pm$ SEM of 8 litters for each group (data in each litter, were obtained from the mean of 4 pups for each sex). The statistical analyses between groups were obtained by Student's t test (A and B) and by one way ANOVA followed by Tukey's test (C, D and E), where the letters on the bars represent statistical difference among groups, in which the letter a depicts the male C-Offspring group; b, male O-Offspring; c, female C-Offspring and letter d, female O-Offspring group, and $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$. Figure C depicts the area under the curve (AUC) of body weight gain during lactation (figures A and B).

Figure 6. Statistical correlation between weaning body weight of rat-offspring and maternal adiposity (A), milk energy content (B) and milk fat content (C). Data are presented as mean of 8 litters for each group and sex (data in each litter, were obtained from the mean of 4 pups for each sex) and 8 mothers. The statistical analyses between groups were obtained by Pearson's correlation.

Figure 7. Statistical correlation between rat-offspring's body weight and milk intake at 6th (A), 11th (B) and 16th (C) days old, and between rat-offspring's body weight at 11th and milk total proteins (D), glucose (E), triglycerides (F), total cholesterol (G), fat content (H) and energy (I). Data are presented as mean of 8 litters for each group and sex (data in each litter, were obtained from the mean of 4 pups for each sex). The statistical analyses between groups were obtained by Pearson's correlation.

Table**Table 1. The macro- and micronutrients in the control chow and the high-caloric diet composition.**

Components	Normal-caloric diet	High-caloric diet
	(g/kg)	(g/kg)
Carbohydrates	655.00	586.35
Proteins (Casen >99%)	220.00	163.20
Lipids	40.00	176.71
Fibers	40.00	28.74
Vitamins mix*	10.00	10.00
Mineral salts mix*	35.00	35.00
Total mass (g)	1,000.00	1,000.00
Total energy (cal/kg)	3,860.00	4,589.00

Data are presented as g/1,000 g of diet. * The mixture of minerals and vitamins used in the manufacture of the diet followed the recommendations of the American Institute of Nutrition [19].

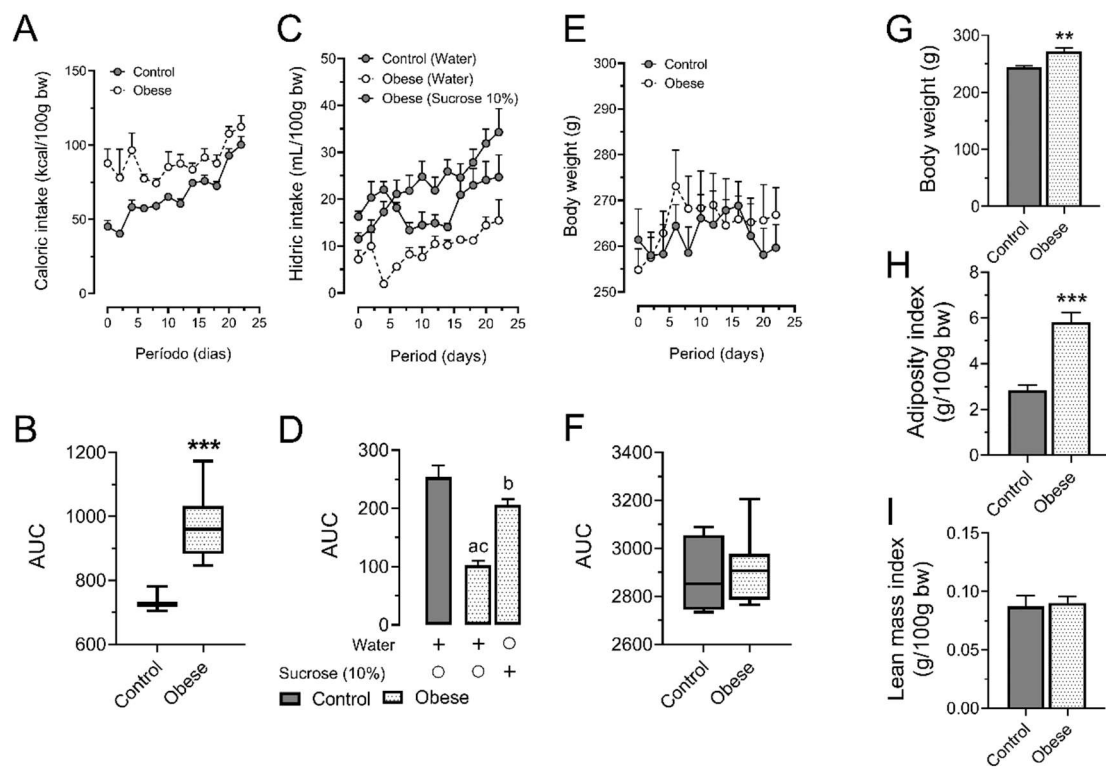
Figure 1.

Figure 2.

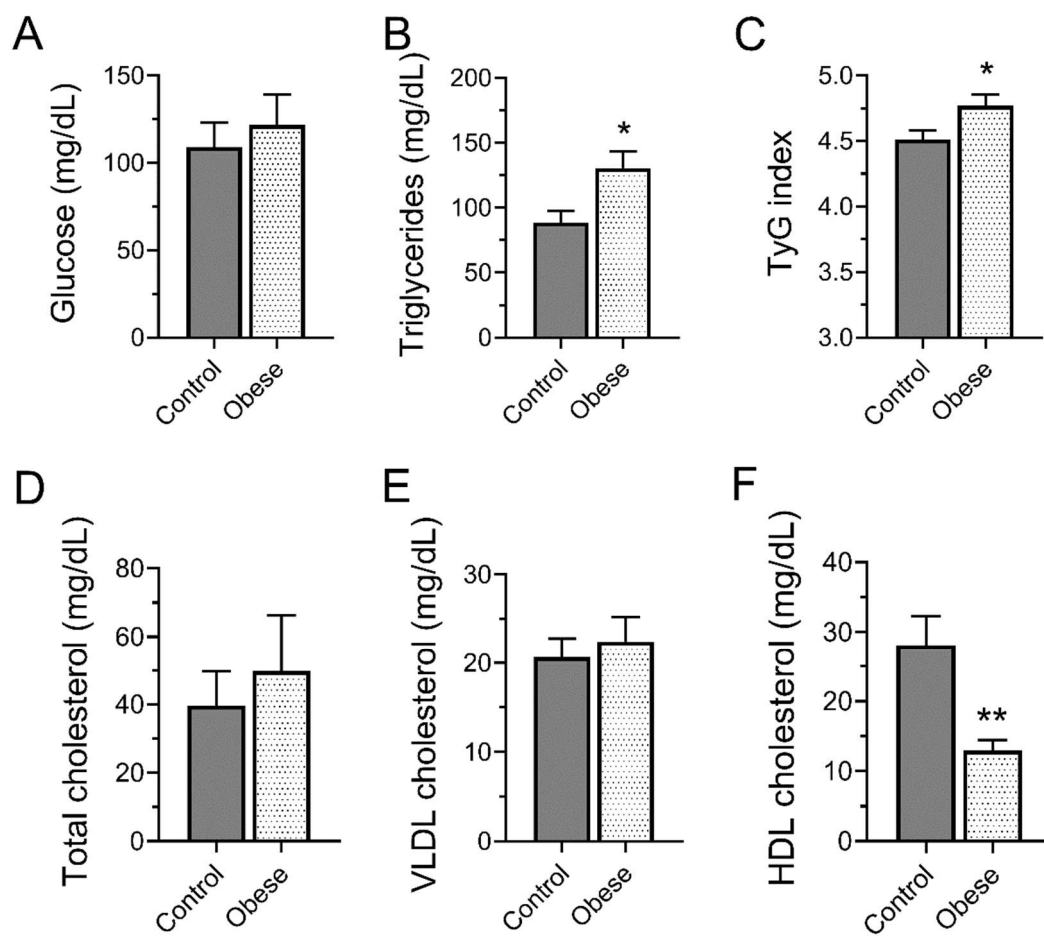


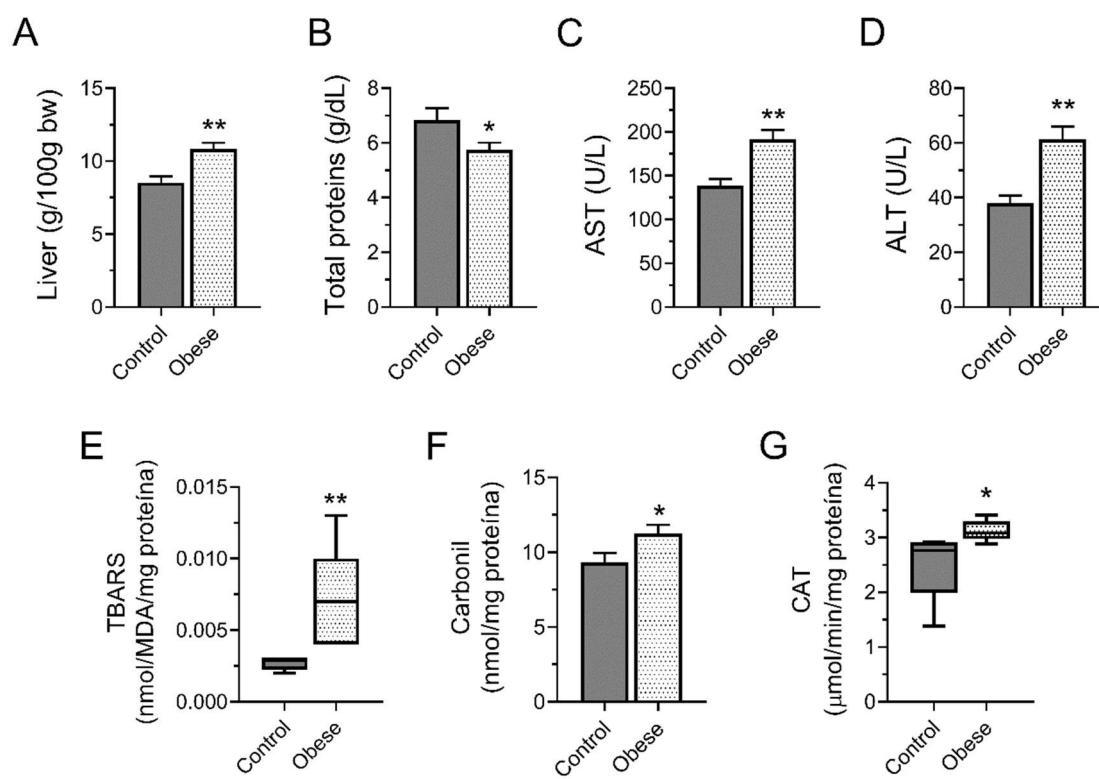
Figure 3.

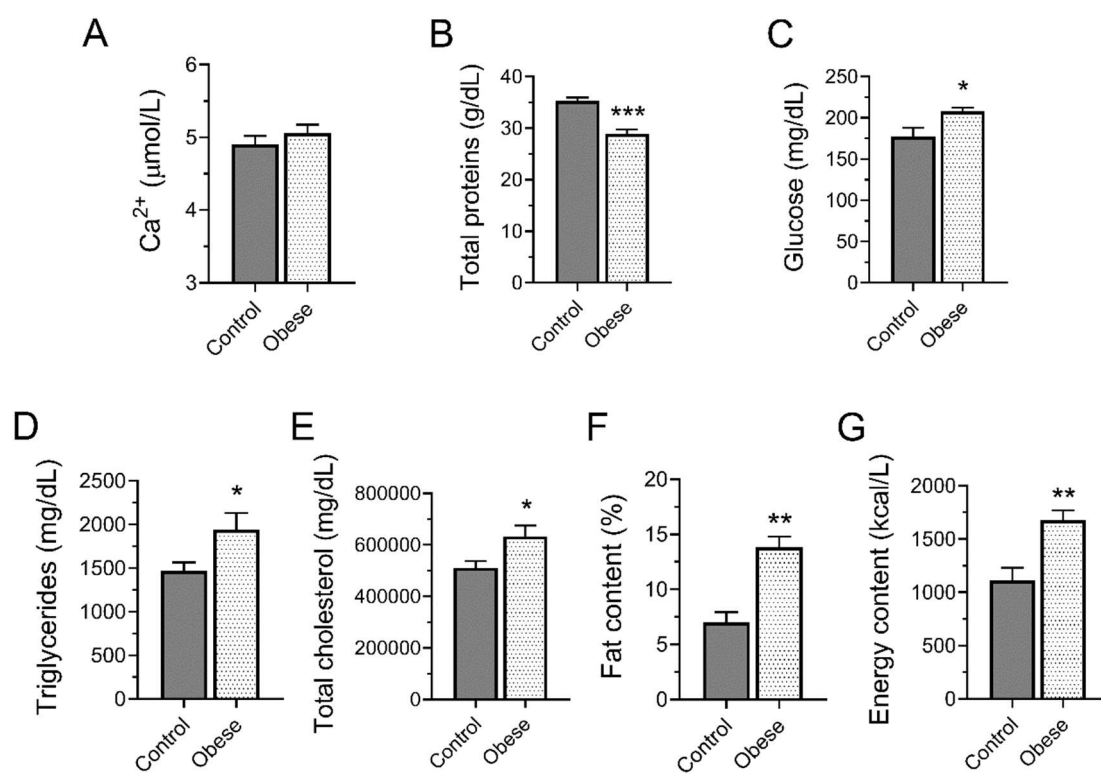
Figure 4.

Figure 5.

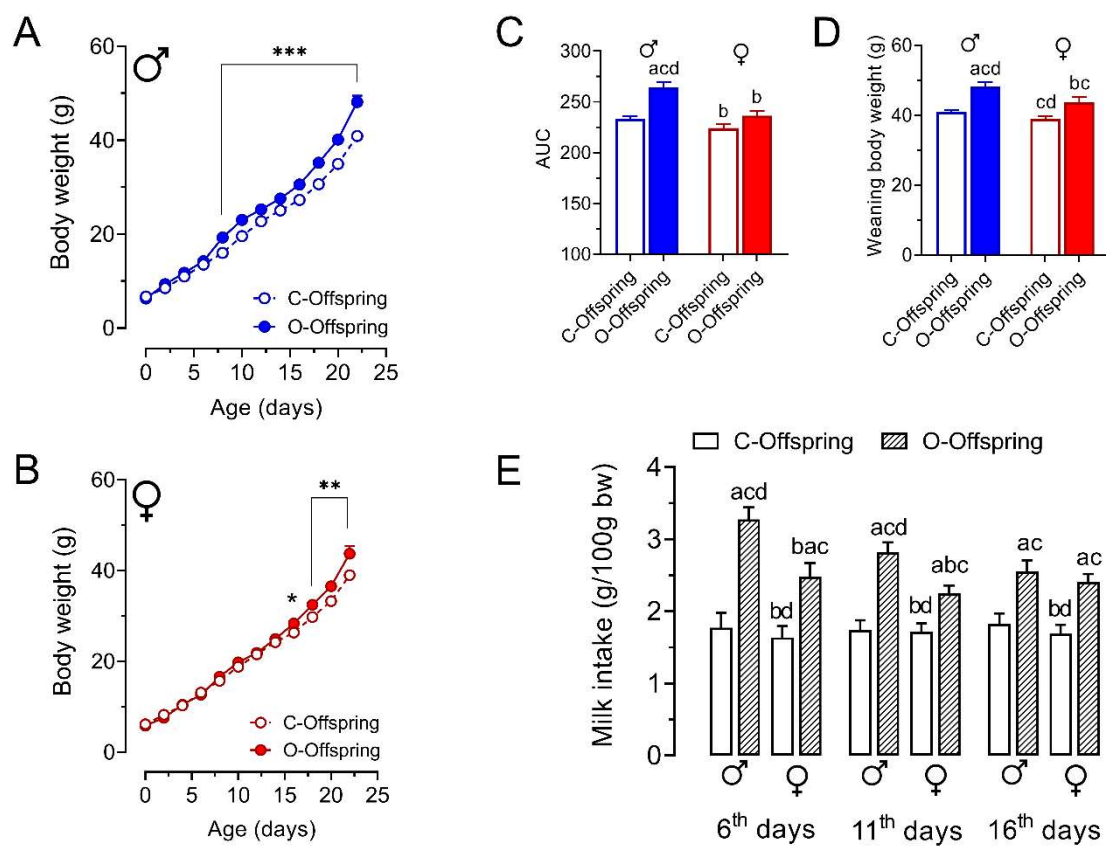


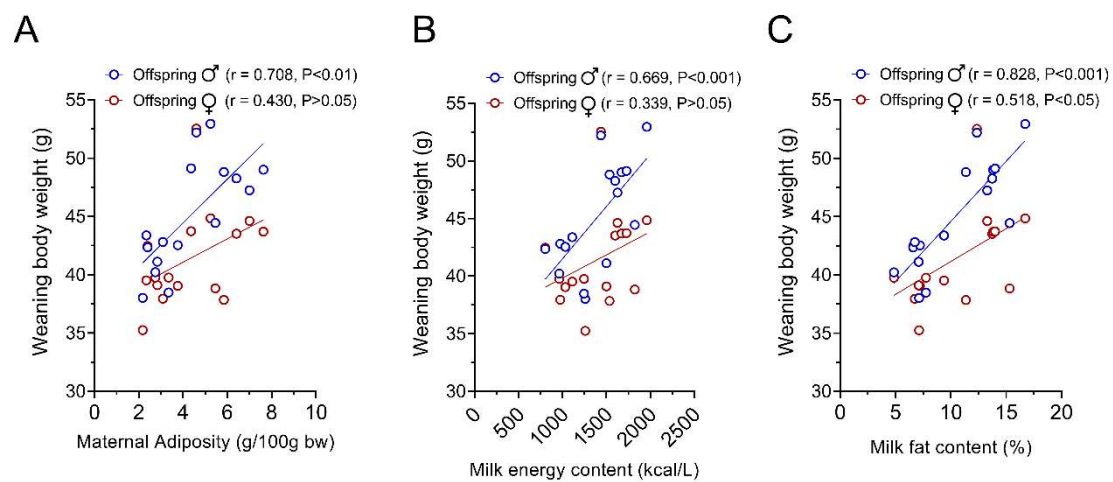
Figure 6.

Figure 7.

