

EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA DURANTE A LACTAÇÃO NO METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO EM RATAS WISTAR ADULTAS

Ariadny Martins de Almeida¹, Julia Berno Oliveira², Rodrigo Vargas³

^{1,2}Acadêmica do Curso de Medicina, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá/PR. ¹Bolsista PIBIC^{MED}/ICETI- UniCesumar. ariadnyalmeidam@gmail.com, julia.bernooliveira@gmail.com

³Orientador, Mestre, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNICESUMAR, Campus Maringá/PR. rodrigo.vargas@docentes.unicesumar.edu.br

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o metabolismo lipídico hepático de ratas Wistar adultas alimentadas com dieta hipoproteica durante a lactação. Para o experimento serão utilizados ratos da linhagem Wistar do sexo feminino, considerando o dia do nascimento como o dia 0 dos filhotes. Os animais serão divididos em dois grupos, o primeiro receberá dieta normoproteica (NP) padrão (Nuvital®, Curitiba/PR, Brasil) para roedores (23,3% de proteína), enquanto que o segundo grupo receberá dieta hipoproteica (*low protein diet*, LP; 4% de proteína) do dia 0 ao dia 14. Os grupos serão padronizados em número de 4 animais por caixa para todos os grupos, e permanecerão com as progenitoras até os 21 dias de vida quando serão desmamados. Após este período, receberão alimentação com dieta NP durante o período experimental do dia 15 ao dia 89. No dia 90 após 12 horas de jejum ocorrerá a pesagem e a coleta de amostra de sangue para dosagem dos valores plasmáticos basais de colesterol, triglicerídeos e HDL-colesterol. Os animais sofrerão eutanásia para a coleta de amostras das gorduras retroperitoneal, mesentérica, ovariana e uterina para avaliação do acúmulo de gordura, além de aproximadamente 500 mg do fígado de cada animal para posterior extração lipídica. Como resultados, espera-se que devido a restrição proteica alimentar durante a lactação, o metabolismo lipídico hepático das ratas altere-se de forma prejudicial, explicando assim os efeitos da programação metabólica que levam a alterações no metabolismo da glicose e diminuição do peso corporal na vida adulta.

PALAVRAS-CHAVE: Programação metabólica; síndrome metabólica; dieta hipoproteica.

1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos em todo o mundo têm demonstrado uma correlação entre má nutrição proteica materna e infantil e consequente predisposição ao risco de obesidade, hipertensão, diabetes tipo II, dislipidemias e hiperinsulinemia na idade adulta (BARKER; OSMOND, 1986). O conceito DOHaD (do inglês: *Developmental Origins of Health and Disease*) (BARKER, 2007) e a hipótese da “programação metabólica fetal” (BARKER, 1995) explicam que condições ambientais subótimas como estresse, desnutrição e a utilização de substâncias tóxicas no período do desenvolvimento pré-natal e pós-natal precoce causam adaptações metabólicas.

Estudos em modelos animais demonstram que filhotes de ratos sujeitos a uma dieta materna de restrição proteica durante a gestação e/ou lactação, apresentam baixo peso ao nascer e síndrome metabólica na vida adulta. Além disso, fornecem dados morfológicos e fisiológicos de que filhotes expostos a esta condição apresentam redução na distribuição corporal de tecido adiposo branco, com níveis reduzidos de leptina e aumento à sensibilidade insulínica em comparação a filhotes não submetido a esta condição (ZAMBRANO et al., 2005; MARTIN-GRONERT et al., 2016; SATO et al., 2017; CAMPISANO et al., 2017; LIRA et al., 2020). Como consequência, ocorrem efeitos negativos no metabolismo oxidativo hepático.

O fígado possui diversas funções vitais. Entre elas, destaca-se a manutenção da glicemia. Na desnutrição, o fígado apresenta déficit de glicose a partir de carboidratos, e passa a sintetizá-la a partir de outros componentes, como ácidos graxos, e como consequência, há produção de corpos cetônicos. Isso leva ao acúmulo de gordura no fígado, pela elevação dos Ácidos Graxos Livres (AGL) na corrente sanguínea (MOURA et al., 2012). De acordo com Ballen et al. (2009), a restrição proteica na prenhez podem

resultar em hiperlipidemia, que interfere na sinalização de insulina, levando a sua resistência, que contribui para a redução da utilização e metabolização da glicose a longo prazo, levando ao quadro de hiperglicemia crônica (COTRAN et al., 1994).

Dados de Peixoto et al., (2018) mostraram que ratos oriundos de matrizes com menor acesso nutricional a proteínas apresentaram menor peso corporal e alterações no metabolismo da glicose na vida adulta. Entretanto, o metabolismo materno não foi analisado. Diante do exposto e da escassez de estudos sobre o tema, hipotetizamos que ratas fêmeas alimentadas com dieta hipoproteica durante a lactação apresentam prejuízos no metabolismo lipídico hepático. Dessa forma, objetivamos avaliar os efeitos dessa dieta sobre o consumo alimentar, evolução do peso corporal, peso das gorduras retroperitoneal, perigonadal, ovariana e uterina; concentração de CT (colesterol total), TG (triglicerídeos), LDL (*Low Density Lipoproteins*), HDL (*High Density Lipoproteins*), VLDL (*Very Low Density Lipoproteins*); histomorfologia do fígado e a quantificação lipídica do fígado.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto contempla novas técnicas experimentais as quais serão desenvolvidas a partir de coletas de amostras biológicas conforme propostas no projeto de doutorado do orientador deste projeto, desenvolvido de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá, aprovado sobre número 3723280918.

Para tal, serão utilizados, ratos adultos da linhagem Wistar, com 70-80 dias de vida, 4 machos e 12 fêmeas, os quais serão mantidos sob condições de luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($23\pm 2^{\circ}\text{C}$) controladas, onde serão mantidos por, aproximadamente, sete dias para aclimação em caixas próprias de polipropileno (15cmx30cmx45cm) com forragem de maravalha, sendo trocadas três vezes por semana por caixas e forramentos limpos. Após este período, os animais serão induzidos ao cruzamento. Será

adotada a proporção de um macho para cada três fêmeas, de maneira que se obtenham linhagens diferentes entre os animais analisados. Após o cruzamento, detectada a prenhez, as fêmeas prenhes serão acondicionadas em caixas individuais até o nascimento natural das ninhadas, que será considerado o dia 0. No dia 0, as matrizes serão divididas em dois grupos, o primeiro receberá dieta normoproteica (NP) padrão (Nuvital®, Curitiba/PR, Brasil) para roedores (23,3% de proteína), enquanto que o segundo grupo receberá dieta hipoproteica (*low protein diet*, LP; 4% de proteína) (MARTINS et al, 2018) do dia 0 ao dia 14, retornando a alimentação com dieta NP ad libitum durante todo período experimental. No dia pós natal 2 (PND 2), as ninhadas terão seu tamanho adequados para 8 animais (4 machos e 4 fêmeas). Os filhotes não utilizados sofrerão eutanásia com dose letal de Tiopental (150mg/kg) mais lidocaína (10 mg/ml).

Esta configuração dará origem a dois grupos experimentais: 1) Grupo NP (n=6) que receberá dieta normoproteica e; 2) Grupo LP (n=6) que receberá dieta hipoproteica durante os primeiros 14 dias da lactação. Somente filhotes fêmeas serão utilizadas nesta etapa do projeto. Filhotes machos serão utilizadas quando necessário para completar as ninhadas. Filhotes excedentes e as ratas (progenitoras) sofrerão eutanásia com dose letal de Tiopental (150mg/kg) mais lidocaína (10 mg/ml). Os filhotes permanecerão com as progenitoras até os 21 dias de vida quando então serão desmamados. Será padronizado o número de 4 animais por caixa para todos os grupos, a fim de garantir as mesmas condições de acesso à comida e água.

As matrizes e ninhadas serão pesadas e será aferido o consumo alimentar diariamente do 1º ao 21º PND. A partir do 21º PND os parâmetros biométricos, assim como o consumo alimentar, serão aferidos semanalmente. Aos 90 dias de vida e após 12

horas de jejum, os animais serão dessensibilizados com gás carbônico em uma câmara de CO₂ para roedores (Insight®, Ribeirão Preto, SP, BRA) e, depois de constatada a sedação, os animais sofrerão eutanásia. O peso corporal e as gorduras retroperitoneal, mesentérica, ovariana e uterina serão retiradas e pesadas para avaliação do acúmulo de gordura.

Os valores plasmáticos basais de colesterol, triglicerídeos e HDL-colesterol serão quantificados a partir das amostras de sangue total coletadas em animais com jejum de 12 horas. O colesterol total será dosado com o método colorimétrico de colesterol oxidase, os triglicerídeos serão dosados pelo método colorimétrico do glicerol-3-fosfato oxidase, o HDL-colesterol será determinado após precipitação de quilomícrons e lipoproteínas de baixa densidade com kit comercial (Gold Analisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil) e posterior determinação através do método acima descrito para dosagem de colesterol total. Para todas as dosagens precedentes serão utilizados kits comerciais (Gold Analisa®, Belo Horizonte/MG, Brasil) e leituras serão realizadas em equipamento de espectrofotometria (Analisador bioquímico semiautomático, BIO200FL, Bio Plus®, São Paulo/SP, Brasil). Os valores de LDL e VLDL serão calculados por meio do cálculo de Friedewald: LDL (mg/dL) = Colesterol total – (Triglicérides/ 5) – HDL; VLDL (mg/dL) = Triglicérides/ 5.

Aproximadamente 500 mg do fígado de cada animal serão removidos e estocados a -20°C, para posterior extração lipídica. O tecido será descongelado e macerado com Politron. Em seguida, será adicionado 20x o peso do tecido de solução clorofórmio/metanol (solução de Folch) na proporção de 2:1. Os tubos serão deixados em repouso overnight à temperatura ambiente, para extração dos lipídeos. No dia seguinte, o extrato será filtrado em papel filtro em frascos previamente pesados os quais serão secados sob uma atmosfera de N₂. A quantidade de gordura extraída será determinada gravimetricamente (FOLCH; LEES; SLOANE-STANLEY, 1957). Após, será adicionado 250 µL de álcool isopropílico, homogeneizado e guardado para posterior dosagem de TG e COL hepáticos.

Aproximadamente 500 mg do fígado serão coletados e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Após fixação, o tecido será lavado, em água corrente, por 24 horas e será desidratado em concentrações ascendentes de álcool, diafanizado em xilol e em seguida, embebido em parafina histológica. Então, serão realizados cortes de 5 µm e os mesmos serão corados pela técnica convencional de Hematoxilina e Eosina para verificar a evolução histológica do fígado com base em um escore para DHGNA e EHNA (KLEINER et al., 2003).

Os resultados serão expressos como média ± erro padrão da média. Para avaliação estatística entre os grupos será utilizada o teste *t de Student*, seguido do pós-teste de Tukey. O nível de significância adotado será de p<0,05. O software utilizado para as análises estatísticas será o *GraphPad Prism* versão 6.00 para Windows (*GraphPad Software*®).

3 RESULTADOS ESPERADOS

Com a oferta de uma restrição proteica alimentar durante a lactação, acredita-se que o metabolismo lipídico hepático das ratas será alterado de forma prejudicial e poderá explicar os efeitos programadores gerados no trabalho de Martins et al. (2018).

REFERÊNCIAS

BALLEN, M. L. O. et al. Restrição proteica na prenhez: efeitos relacionados ao metabolismo materno. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 53, n. 1, p. 87-94, 2009.

BARKER, D. J.; OSMOND. C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. **Lancet.**, Londres. v.1, n.8489, p. 1077-1081, Mai. 1986.

BARKER, D. J. P. The fetal and infant origins of disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 25, n. 7, p. 457-463, 1995.

BARKER, D. J., et al. Maternal and social origins of hypertension. **Hypertension.**, Dallas. v. 50, n. 3, p. 565-571, 2007.

BARKER, D. J. P. The origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, p. 412-417, 2007.

CAMPISANO, S. E. et al. Protein malnutrition during fetal programming induces fatty liver in adult male offspring rats. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 73, n. 2, p. 275-285, 2017.

LIRA, A. DE O. et al. Maternal low protein diet induces persistent expression changes in metabolic genes in male rats. **World Journal of Diabetes**, v. 11, n. 5, p. 182-192, 2020.

MARTIN-GRONERT, M. S. et al. Cell-autonomous programming of rat adipose tissue insulin signalling proteins by maternal nutrition. **Diabetologia**, v. 59, n. 6, p. 1266-1275, 2016.

MARTINS, I. P. et al. Protein-restriction diet during the sucking phase programs rat metabolism against obesity and insulin resistance exacerbation induced by a high-fat diet in adulthood. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 57, p. 153-161, 2018.

MOURA, L. P. et al. Alterações bioquímicas e hepáticas em ratos submetidos a uma dieta hiperlipídica/hiperenergética. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 25, n. 6, p. 685-693, 2012.

SATO, N. et al. Early gestational maternal low-protein diet diminishes hepatic response to fasting in young adult male mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2017.

VICKERS, M.H. et al. Dysregulation of the adipoinular axis- a mechanism for the pathogenesis of hyperleptinemia and adipogenic diabetes induced by fetal programming. **Journal of Endocrinology**, v. 170, p. 323-332, 2001.

ZAMBRANO, E. 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. **Journal of Physiology**, v. 566, n. 1, p. 225-236, 2005.