



## A RESTRIÇÃO PROTEICA DURANTE A LACTAÇÃO ALTERA O METABOLISMO LIPÍDICO HEPÁTICO EM RATAS WISTAR ADULTAS

Ariadny Martins de Almeida<sup>1</sup>, Julia Berno Oliveira<sup>2</sup>, Rodrigo Vargas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica do Curso de Medicina, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá/PR. Bolsista PIBIC-MED/ICETI- Unicesumar. ariadnyalmeidam@gmail.com

<sup>2</sup>Acadêmica do Curso de Medicina, Universidade Cesumar – UNICESUMAR, Campus Maringá/PR. julia.bernooliveira@gmail.com

<sup>3</sup>Orientador, Mestre, Docente do Curso Ciências Biológicas, UNICESUMAR. rodrigo.vargas@docentes.unicesumar.edu.br

### RESUMO

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. O objetivo deste trabalho foi avaliar o metabolismo lipídico hepático de ratas Wistar adultas alimentadas com dieta hipoproteica durante a lactação. As fêmeas de ratos Wistar receberam dieta normoproteica (NP) padrão para roedores (23,3% de proteína) ou (*low protein diet*; LP; 4% de proteína) durante a lactação. Após o desmame da descendência feminina, estas ratas foram alimentadas com NP durante o período experimental. No dia 90 foi realizada a pesagem e a coleta de amostras de sangue para dosagem dos valores plasmáticos basais de colesterol, triglicerídeos e HDL-colesterol. Os animais sofreram eutanásia para a coleta de dados das gorduras retroperitoneal, mesentérica, ovariana e uterina para avaliação do acúmulo de gordura, além de amostras do fígado. Os nossos resultados mostram que a restrição do consumo de proteínas durante a lactação das fêmeas induziu a uma perda de peso corporal, redução de gorduras viscerais, além de redução no peso do fígado. Também verificamos que os níveis plasmáticos de triglicerídeos diminuíram, enquanto os níveis hepáticos aumentaram, e o contrário ocorreu com os níveis de colesterol, com grande redução de HDL (37%). Concluímos que a dieta materna hipoproteica leva ao dano hepático da prole e o desenvolvimento de fatores de risco para doenças metabólicas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Dieta hipoproteica; Programação metabólica; Síndrome metabólica.

### 1 INTRODUÇÃO

Estudos epidemiológicos globais demonstram 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). Objetivando explicar o crescente número destas DCNTs, 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. A fim de garantir a prole condições melhores de sobrevivência ocorre um fenômeno conhecido como plasticidade do desenvolvimento, mecanismo pelo qual há seleção de genes que levarão a uma modificação metabólica e fenotípica com o objetivo de adequação ao ambiente em que o indivíduo será inserido (KIMM, 2004; WELLS, 2010; BENYSHEK, 2013; PORTHA *et al.*, 2014).

Um dos principais fatores não genéticos envolvidos no surgimento de doenças metabólicas aliadas à obesidade é a desnutrição (BARKER *et al.*, 2007). De acordo com Lucas (2000) a desnutrição no período perinatal pode levar a efeitos irreversíveis com consequências negativas para o acontecimento de eventos metabólicos. Em especial, leva a efeitos no metabolismo oxidativo hepático. 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).



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, os quais poderiam esclarecer os efeitos da programação metabólica apresentada pelos autores supracitados.

## 2 METODOLOGIA

Este projeto foi 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, foi utilizado, ratos adultos da linhagem Wistar, com 70-80 dias de vida, 4 machos e 12 fêmeas. Após este período, os animais foram induzidos ao cruzamento. Após o cruzamento, detectada a prenhes, as fêmeas prenhes foram acondicionadas em caixas individuais até o nascimento natural das ninhadas, que foi considerado o dia 0. No dia 0, as matrizes foram divididas em dois grupos, o primeiro recebeu dieta normoproteica (NP) padrão (Nuvital®, Curitiba/PR, Brasil) para roedores (23,3% de proteína), enquanto que o segundo grupo recebeu dieta hipoproteica (*low protein diet*; LP; 4% de proteína) (MARTINS, I. P. *et al*, 2018) do dia 0 ao dia 14, retornando à alimentação com dieta NP ad libitum durante todo período experimental. No dia pós-natal 2 (PND 2), as ninhadas estavam com tamanho adequados para 8 animais (4 machos e 4 fêmeas). Os filhotes não utilizados sofreram eutanásia com dose letal de Tiopental (150mg/kg) mais lidocaína (10 mg/ml). Esta configuração deu origem a dois grupos experimentais:

1) Grupo NP (n=6) que recebeu dieta normoproteica e;

2) Grupo LP (n=6) que recebeu dieta hipoproteica durante os primeiros 14 dias da lactação.

Somente filhotes fêmeas foram utilizados nesta etapa do projeto. Os filhotes permaneceram com as progenitoras até os 21 dias de vida, quando então foram desmamados.

As matrizes e ninhadas foram pesadas e foi aferido o consumo alimentar diariamente do 1º ao 21º PND. A partir do 21º PND os parâmetros biométricos, assim como o consumo alimentar, foram aferidos semanalmente. Aos 90 dias de vida e após 12 horas de jejum, os animais foram dessensibilizados com gás carbônico em uma câmara de CO<sub>2</sub> para roedores (Insight®, Ribeirão Preto, SP, BRA) e, depois de constatada a sedação, os animais sofreram eutanásia. O peso corporal e as gorduras retroperitoneal, mesentérica, ovariana e uterina foram retiradas e pesadas para avaliação do acúmulo de gordura.

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

$LDL \text{ (mg/dL)} = \text{Colesterol total} - (\text{Triglicérides} / 5) - HDL$

$VLDL \text{ (mg/dL)} = \text{Triglicérides} / 5$

Aproximadamente 500 mg do fígado de cada animal foram removidos e estocados a -20°C, e posterior extração lipídica. O tecido foi descongelado e macerado com Politron. Em seguida, foi



adicionado 20x o peso do tecido de solução clorofórmio/metanol (solução de Folch) na proporção de 2:1. Os tubos foram deixados em repouso overnight à temperatura ambiente, para extração dos lipídeos. No dia seguinte, o extrato foi filtrado em papel filtro em frascos previamente pesados os quais foram secados sob uma atmosfera de N<sub>2</sub>. A quantidade de gordura extraída foi determinada gravimetricamente (FOLCH; LEES; SLOANE-STANLEY, 1957). Após, foi adicionado 250 µL de álcool isopropílico, homogeneizado e guardado para posterior dosagem de TG e COL hepáticos.

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. Para avaliação estatística entre os grupos foi utilizado 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

As fêmeas do grupo LP (9652 ± 186,7) apresentaram redução de 22,05% na evolução do peso corporal em relação às fêmeas do grupo NP (12382 ± 229,0) ( $P < 0,0001$ ). O consumo alimentar das fêmeas do grupo LP (796,4 ± 9,33) foi 19,54% maior em relação ao consumo alimentar das fêmeas do grupo NP (666,2 ± 7,8) ( $P < 0,001$ ).

As ratas do grupo LP (199,9 ± 3,178) obtiveram redução de 18% no peso corporal aos 90 dias em comparação as ratas do grupo NP (243,8 ± 2,988) ( $P < 0,0001$ ). As ratas do grupo LP (3,584 ± 0,2159) apresentaram redução de 11,48% na pesagem de fígado em relação às ratas do grupo NP (4,049 ± 0,04981) ( $P < 0,05$ ). Os pesos relativos de pâncreas e ovários não apresentaram diferença estatística relevante entre os grupos LP e NP.

Os animais do grupo LP (0,4484 ± 0,02866) apresentaram redução de 45,67% de gordura retroperitoneal em comparação aos animais do grupo NP (0,8254 ± 0,07703) ( $P < 0,0001$ ). Os animais do grupo LP (0,5468 ± 0,07610) apresentaram redução de 38,10% de gordura periuterina em comparação aos animais do grupo NP (0,8834 ± 0,1046) ( $P < 0,05$ ). Os animais do grupo LP (0,5238 ± 0,06221) apresentaram redução de 27,71% de gordura periovariana em comparação aos animais do grupo NP (0,7246 ± 0,06713) ( $P < 0,05$ ). Os animais do grupo LP (0,5153 ± 0,03987) apresentaram redução de 23,78% de gordura mesentérica em comparação aos animais do grupo NP (0,6761 ± 0,04959) ( $P < 0,05$ ).

As fêmeas do grupo LP (53,83 ± 2,714) apresentaram redução de 16,26% no colesterol total em comparação aos animais do grupo NP (64,28 ± 4,068) ( $P < 0,05$ ). As fêmeas do grupo LP não apresentaram diferença estatística relevante em comparação aos animais do grupo NP. As ratas do grupo LP (20,67 ± 1,965) apresentaram redução de 37,68% no HDL em comparação aos animais do grupo NP (33,17 ± 2,701) ( $P < 0,01$ ).

As fêmeas do grupo LP (311,4 ± 7,447) apresentaram aumento de 13,17% no conteúdo hepático de CHOL em comparação aos animais do grupo NP (311,4 ± 7,447) ( $P < 0,05$ ). As ratas do grupo LP (294,6 ± 40,52) apresentaram redução de 30% no conteúdo hepático de TG em comparação aos animais do grupo NP (420,8 ± 29,04) ( $P < 0,05$ ).

As ratas do grupo LP não apresentaram diferença estatística significativa nas enzimas do sistema antioxidante em comparação aos animais do grupo NP. Os animais do grupo LP (21,20 ± 0,7559) apresentaram aumento de 25,44% no conteúdo hepático de LOOH em comparação aos animais do grupo NP (16,90 ± 1,322) ( $P < 0,05$ ).

### 4 DISCUSSÕES



A restrição proteica durante 14 dias de lactação das fêmeas resultou em diminuição do peso corporal total de suas descendentes fêmeas, como demonstrado por outros autores (PODAZA; ECHARTE; CHISARI, 2015; SAVITIKADI *et al.*, 2021). Em contrapartida, ocorreu uma ingestão alimentar maior do que a esperada nos animais desnutridos, sendo associado a uma maior necessidade alimentar para suprir o mesmo consumo energético de animais não desnutridos (SAVITIKADI *et al.*, 2021). O nosso estudo revelou uma redução de gordura retroperitoneal, periuterina, periovariana e mesentérica. A redução do peso de gordura retroperitoneal e periuterina são um indicativo para proteção às doenças cardiovasculares nestas proles, já que o aumento destas gorduras está intimamente relacionado à obesidade, por exemplo. Estudos anteriores também demonstraram uma correlação entre a má nutrição durante a gestação e/ou lactação com a redução de massa gorda corporal, mas em descendentes machos (MARTINS *et al.*, 2018; SAVITIKADI *et al.*, 2021).

A redução do peso do fígado (11%) sugere uma adaptação fisiológica às custas de um ambiente desfavorável, mas também, pode estar relacionada a um efeito negativo do aumento hidroperóxidos de lipídios (LOOH) e hidroperóxidos de cardiolipina (CLOOH). Os pâncreas e os ovários também foram analisados, mas não houve significativa redução de peso destes órgãos em comparação à animais nutridos, diferente do estudo realizado em machos (SAVITIKADI *et al.*, 2021).

Ainda de acordo com Schmidt (2005), a deficiência proteica do leite materno, como consequência à restrição de aminoácidos materna, também pode contribuir para a menor síntese de apolipoproteínas que fazem que o transporte e utilização de lipoproteínas e triglicerídeos no organismo da prole. Em relação ao conteúdo hepático de colesterol, houve um aumento, em comparação aos seus níveis plasmáticos. Isso sugere que os hepatócitos sofreram alterações afetando sua integridade (CAMPISANO *et al.*, 2017).

Estudos mostraram que a desnutrição proteica causa estresse oxidativo no fígado (LI *et al.*, 2003), levando ao aumento da produção de EROS, que também se relaciona a diferentes estágios da doença hepática. Neste estudo, encontramos o marcador de estresse oxidativo (LOOH) aumentado na prole, cujas mães receberam dieta hipoprotéica, em relação ao grupo controle, que denota uma maior lesão hepática.

## 5 CONCLUSÃO

A restrição proteica materna durante a lactação, induz na prole um dano hepático estrutural e funcional e no metabolismo lipídico na prole. Esses resultados sugerem que a programação fetal no modelo de dieta com baixa proteína, pode levar ao surgimento de diversas consequências a longo prazo ao organismo da prole, com o desenvolvimento de doenças hepáticas, cardiovasculares, além de deficiências nutricionais, baixo peso corporal e de órgãos essenciais. Mais estudos serão necessários para elucidar os efeitos da restrição proteica no desenvolvimento de doenças metabólicas na prole.

## REFERÊNCIAS

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 origins of the developmental origins theory. **Journal of Internal Medicine**, v. 261, n. 5, p. 412–417, 2007.

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

BENYSHEK, D. C. The “early life” origins of obesity-related health disorders: new discoveries regarding the intergenerational transmission of developmentally programmed traits in the global cardiometabolic health crisis. **American journal of physical anthropology**, v. 152 Suppl 57, p. 79–93, 2013.

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.

FOLCH J. *et al.* A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

KIMM, S. Y. S. Fetal origins of adult disease: The Barker hypothesis revisited-2004. **Current Opinion in Endocrinology and Diabetes**, v. 11, n. 4, p. 192–196, 2004.

LUCAS, A. Programming not metabolic imprinting. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda. v. 71, n. 2, p. 602. 2000.

MARTINS, I. P. *et al.* Protein-restriction diet during the suckling phase programs rat metabolism against obesity and insulin resistance exacerbation induced by a high-fat diet in adulthood. **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**, v. 25, n. 6, p. 685-693. 2012.

PODAZA, E.; ECHARTE, S. M.; CHISARI, A. N. A low maternal protein diet during pregnancy and lactation induce liver offspring damage in the rat. **Annals of Nutritional Disorders & Therapy**, v. 2, n. 1, p. 1–5, 2015.

PORTHA, B. *et al.* Early environmental factors, alteration of epigenetic marks and metabolic disease susceptibility. **Biochimie**, v. 97, n. 1, p. 1–15, 2014.

SAVITIKADI, P. *et al.* Chronic Effects of Maternal Low-Protein and Low-Quality Protein Diets on Body Composition, Glucose-Homeostasis and Metabolic Factors, Followed by Reversible Changes upon Rehabilitation in Adult Rat Offspring. **Nutrients**, v. 13, n. 11, p. 1-19. 2021.

SCHMIDT, L. Avaliação nutricional de ratos Wistar com 21 dias de idade cujas mães foram alimentadas com dietas contendo farelo de arroz. 2005. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.



WELLS, J. C. K. Maternal capital and the metabolic ghetto: An evolutionary perspective on the transgenerational basis of health inequalities. **American Journal of Human Biology**, v. 22, n. 1, p. 1–17, 2010.