



METFORMINA NA ADOLESCÊNCIA NORMALIZA AS ALTERAÇÕES METABÓLICAS DE RATOS SUPERALIMENTADOS

Thayla de Souza Fernandes¹, Scarlett Rodrigues Raposo², Leticia Ferreira Barbosa²,
Rafael Pereira Lopes², Danielle Kurunzi¹, Paulo Cesar de Freitas Mathias²

¹Nutrição – Centro Universitário de Maringá - UNICESUMAR

²Pós graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Estadual de Maringá-UEM (Bolsista CNPq/CAPES)

RESUMO

O conceito DOHaD (Origens Desenvolvimentistas da Saúde e Doença) reconhece a adolescência como um período-chave de plasticidade biológica, com impacto sobre a saúde. Este estudo investigou os efeitos do tratamento com metformina durante a adolescência em ratos que sofreram superalimentação na fase de lactação, por meio da redução do tamanho da ninhada, protocolo que leva a distúrbios metabólicos. A metformina foi administrada dos 30 aos 60 dias de vida (300 mg/kg/dia) na água de beber. Foram avaliados parâmetros biométricos como o peso corporal e peso das gorduras ao final do protocolo. Ratos superalimentados (SL) apresentaram aumento do peso corporal ($p < 0,0001$) e maior acúmulo de gordura abdominal ($p < 0,0001$). O uso de metformina na adolescência atenuou o ganho de peso ($p < 0,01$) e reduziu depósitos de gordura. Esses resultados reforçam que a adolescência é uma janela sensível para intervenções e sugerem que a metformina pode ter efeitos benéficos quando há risco metabólico.

PALAVRAS-CHAVES: DOHaD; Obesidade; Rato wistar.

1 INTRODUÇÃO

O conceito de Origens do Desenvolvimento da Saúde e da Doença (DOHaD) surgiu como uma estrutura interdisciplinar que explora como eventos no início da vida moldam o risco de saúde e doença a longo prazo (Santos Júnior et al., 2023), propondo que exposições ambientais nas fases iniciais da vida, como a gestação, lactação e adolescência influenciam de maneira duradoura a fisiologia e o metabolismo do indivíduo. Esse conceito é sustentado por evidências que associam modificações precoces a um risco aumentado para doenças crônicas não transmissíveis na vida adulta, como obesidade, diabetes tipo 2 e hipertensão arterial (Santos Júnior et al., 2023). Durante essas janelas críticas de desenvolvimento, o organismo apresenta elevada plasticidade fenotípica, o que permite respostas adaptativas a estímulos ambientais por meio de mecanismos epigenéticos.

Um exemplo amplamente utilizado para estudar esse fenômeno é o modelo experimental de redução do tamanho da ninhada em roedores, o qual simula uma situação de superalimentação durante o período de lactação. Essa manipulação simples ao diminuir o número de filhotes por mãe proporciona maior acesso ao leite materno e, conseqüentemente, resulta em um excesso calórico nos primeiros dias de vida e diversos estudos demonstram que essa condição promove alterações metabólicas que permanecem ao longo da vida, como aumento de tecido adiposo, dislipidemia, hiperinsulinemia e resistência à insulina (Souza et al., 2022). Tais efeitos são compreendidos como resultado de um processo de “programação metabólica”, no qual o organismo realiza ajustes fisiológicos de forma inadequada ao ambiente futuro, o que favorece o surgimento de comorbidades (Souza et al., 2022).

A maior parte da literatura sobre DOHaD se concentra sobretudo em estudos da programação fetal e lactação; porém, a fase da adolescência pode ser a última oportunidade para uma intervenção para mitigar a programação precoce na gravidez, lactação e infância (Tohi et al., 2023). Durante a adolescência, além das mudanças fisiológicas e hormonais, o cérebro também passa por intenso remodelamento estrutural e



funcional, afetando áreas relacionadas à regulação do apetite, controle emocional e tomada de decisões (Sisk; Foster, 2004; Spear, 2000).

Com base nisso, levantamos a hipótese de que o tratamento com metformina ao longo de toda a adolescência pode ajudar a amenizar os impactos metabólicos causados pela superalimentação precoce.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os protocolos experimentais seguiram a legislação do Conselho Nacional de Controle de Experimentação animal – CONCEA e as diretrizes ARRIVE (Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments) (número: 4718150623).

Ratos Wistar adultos, fêmeas (N= 20) e machos (N=10), foram adquiridos junto ao Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM), e acondicionados no Biotério Setorial do LEX DOHaD – Laboratório Experimental de DOHaD. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno com as dimensões de 15cm; 30cm; 45 cm, para altura, largura e comprimento respectivamente. Todas as caixas foram forradas internamente com maravalha, sendo trocadas três vezes por semana por caixas e forramento limpos. Os animais foram mantidos em um ambiente climatizado com temperatura de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, ciclo foto-período de 12 horas (7:00-19:00 horas, período claro), com livre acesso à água e ração (Nuvital®, Curitiba, Brasil). Após uma semana de aclimação, os animais foram alocados em caixas para cruzamento, na proporção de duas fêmeas para um macho. Constatada a prenhez, as fêmeas permaneceram em caixas individuais com livre acesso a ração comercial (Nuvilab® CR-1) e água até o nascimento dos filhotes, sendo este considerado dia 0. No dia 3 após o nascimento, as ninhadas foram ajustadas para 9 filhotes por lactante no grupo Ninhada Normal (NL) e 3 filhotes por lactante no grupo Redução de Ninhada (SL), dando-se preferência para a utilização de animais machos. O ajuste de ninhadas é necessário para o modelo de indução de disfunção metabólica durante a lactação o que altera a oferta de leite aos filhotes durante a lactação. Após o desmame que ocorreu aos 21 dias de vida, os animais tiveram livre acesso a água e ração comercial. Apenas machos foram utilizados haja vista o dimorfismo sexual entre machos e fêmeas, bem como as flutuações hormonais que as fêmeas sofrem durante o ciclo estral, o que altera o seu metabolismo e comportamento, podendo gerar vieses nas análises a serem realizadas.

Aos 30 dias de vida os animais foram separados em 2 novos grupos: Controle (C) e Metformina (M). Dos 30 aos 60 dias, um grupo de animais foi tratado com Metformina diluída na água de beber na dose de 300mg/kg (Salomäki et al., 2013), dando origem aos grupos NL-M e SL-M enquanto que o grupo controle recebeu água filtrada, dando origem aos grupos NL-C e SL-C. O método de tratamento foi escolhido para minimizar ao máximo o estresse dos animais e o fim do protocolo foi aos 60 dias (Figura 1).

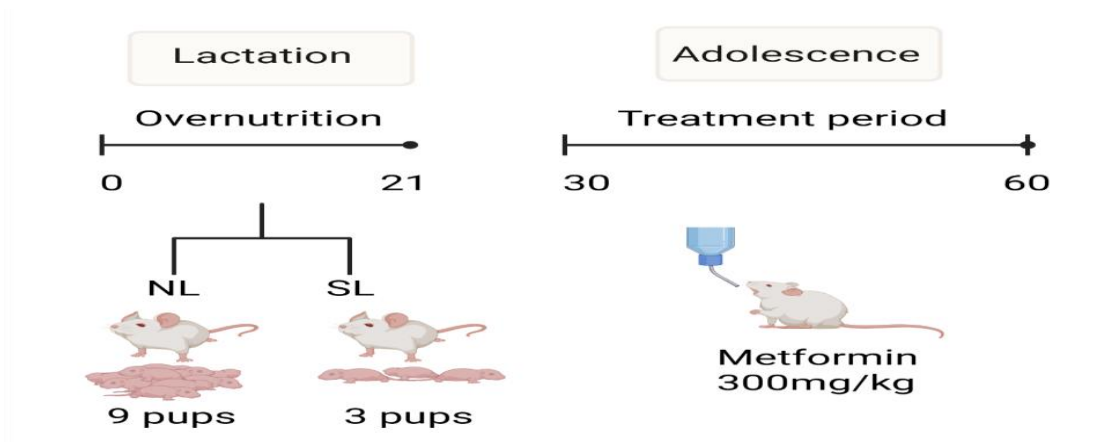


Figura 1. Protocolo experimental. Ninhada normal (NL), ninhada reduzida (SL), metformina (M), controle (C).

2.2 AVALIAÇÕES BIOMÉTRICAS E BIOQUÍMICAS

Peso corporal e consumo alimentar foram avaliados semanalmente a partir do desmame que ocorreu no dia 21 até o fim do protocolo experimental. A avaliação da ingestão hídrica ocorreu apenas durante o período de tratamento (dos 30 aos 60 dias) a cada 2 dias, e o fim do protocolo experimental foi aos 60 dias. Os animais foram submetidos a uma laparotomia, os estoques de gordura (retroperitoneal, perigonadal e mesentérica) e fígado, foram retirados e pesados (normalizados com o peso corporal [g/100g peso corporal]) como estimativa da adiposidade.

2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados são expressos como média \pm erro padrão da média (SEM) e submetidos ao Teste de normalidade de D'Agostino Pearson para avaliar a Distribuição Gaussiana. Os dados foram submetidos à análise de variância ANOVA de duas vias, ou teste T de Student quando necessário. As diferenças entre as médias foram avaliadas pelo post hoc teste de Tukey. Um valor de $P < 0,05$ foi considerado significativo. Os testes foram feitos usando GraphPad Prism versão 9.0 para Windows.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Ao analisarmos o peso corporal final aos 30 dias de vida, verificamos que os animais do grupo SL apresentaram peso significativamente superior ao dos animais NL, confirmando que o modelo foi reproduzido com sucesso ($p < 0,0001$) (Figura 1A). Aos 60 dias, ao término do período de tratamento, aparece um efeito da intervenção farmacológica ($p < 0,05$) (Figura 2A). Comparando especificamente os grupos SL-C e SL-M, observamos uma diferença ainda mais expressiva, com os animais tratados com metformina apresentando menor peso corporal em relação aos controles não tratados, (SL-C: $298,4 \pm 46$ vs SL-M: $275,7 \pm 5$; $p < 0,01$). Corroborando com nossos achados, Parra-Vargas et al. (2023) relatam que a criação de roedores em ninhadas reduzidas está diretamente associada ao aumento do peso corporal. Segundo os autores, o maior acesso ao leite materno durante o



período de lactação, característico das ninhadas pequenas, favorece a superalimentação neonatal, o crescimento acelerado e o desenvolvimento de um fenótipo obeso. Vale destacar que os animais NL tratados com metformina não apresentaram alteração no peso corporal.

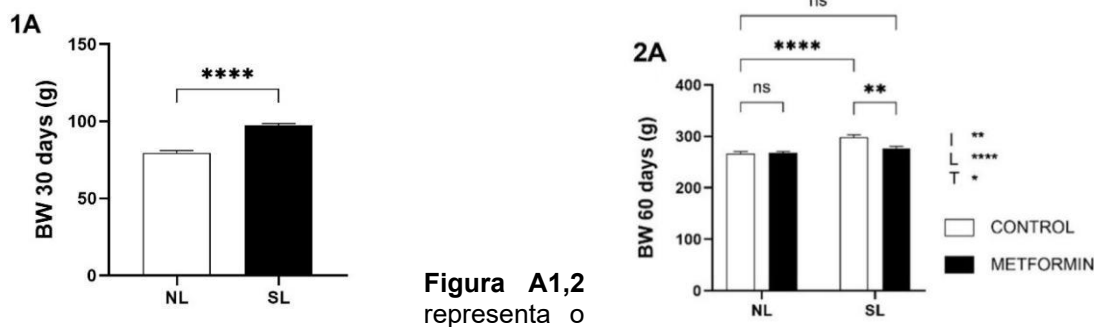


Figura A1,2 representa o peso final nas idades 30-60 dias respectivamente. Todos os dados são expressos como a média \pm SEM, tendo de 8-12 animais de 5 ninhadas diferentes. NL-C, ratos de ninhada normal; SL-C, ratos de ninhada reduzida; NL-M, ratos de ninhada normal tratados com metformina; SL-M, ratos de ninhada reduzida tratados com metformina. L, ninhada; T, tratamento; I, interação entre os fatores ninhada e tratamento. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

3.2 PESO GORDURAS

Analizamos o peso relativo das gorduras mesentérica, perigonadal e retroperigonadal aos 30 e 60 dias e verificamos que os animais do grupo SL aos 30 dias todas as gorduras obtiveram aumento significativo (figura 3A, B e C) (mesentérica $p < 0,01$; perigonadal, $p < 0,001$; retroperitoneal, $p < 0,001$).

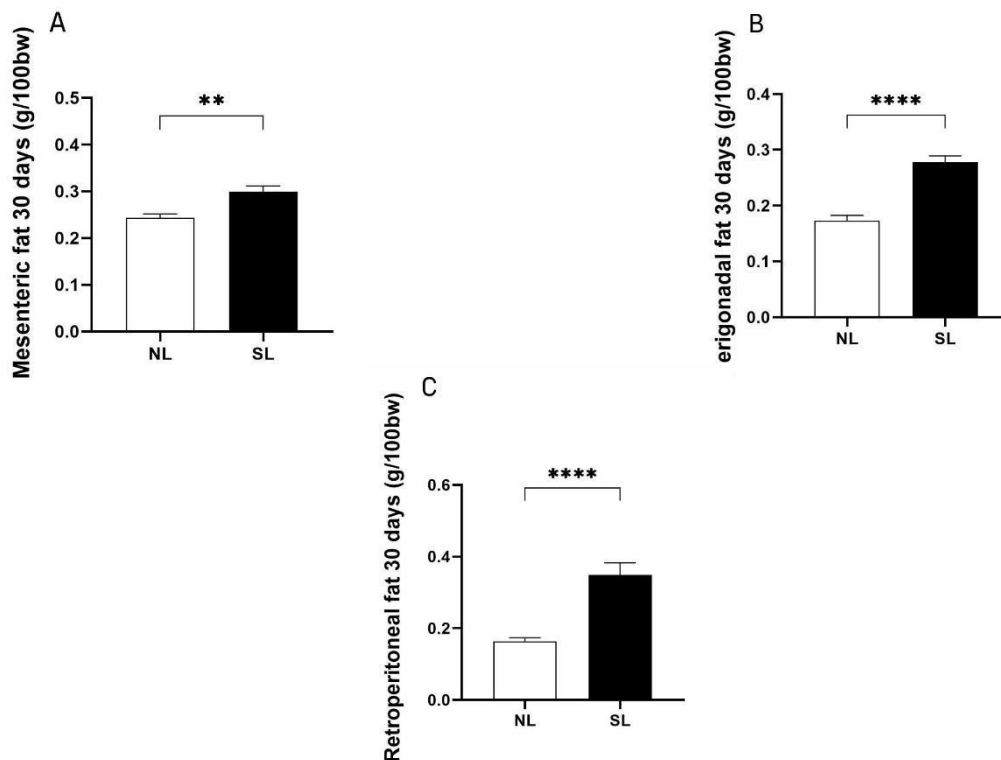


Figura 3A, B e C. Avaliação dos depósitos de gordura visceral. (A) Gordura mesentérica, (B) gordura perigonadal e (C) gordura retroperitoneal nos grupos (NL) e (SL).



Aos 60 dias, observamos que em todas as gorduras avaliadas, apresentam efeitos de ninhada, mostrando que os animais SL possuem estes estoques aumentados (figura 4A, B e C; sendo mesentérica e perigonadal, $p < 0,001$; retroperitoneal, $p < 0,05$; respectivamente). Além disso, nas gorduras mesentérica e perigonadal aparece um efeito de tratamento, ou seja, a metformina consegue diminuir estes estoques de gordura ($p < 0,05$). Os dados de aumento de gordura visceral nos animais SL estão alinhados com os resultados discutidos por Parra-Vargas et al. (2023), que demonstram que a redução do tamanho da ninhada promove maior acúmulo de tecido adiposo, especialmente nos depósitos viscerais, o que está associado à ativação precoce de sinais de distúrbios metabólicos e a uma maior propensão ao desenvolvimento de obesidade na vida adulta.

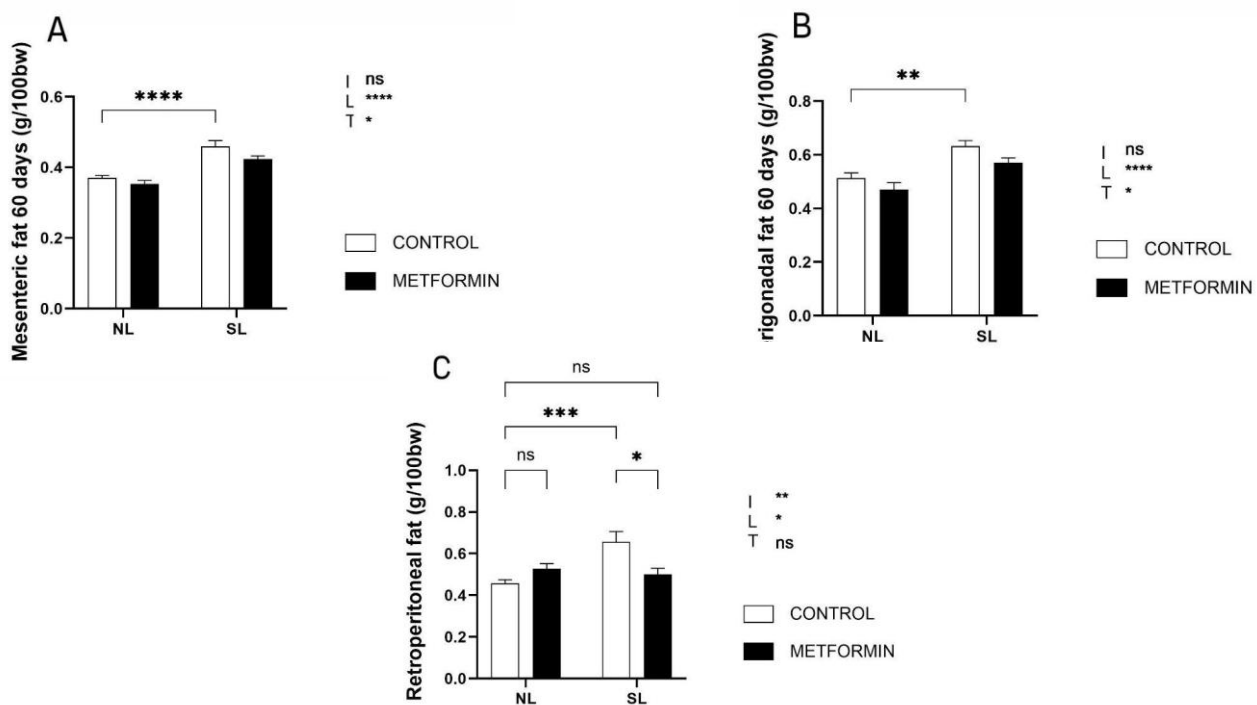


Figura 4. Depósitos de gordura visceral aos 60 dias. (A) Gordura mesentérica, (B) gordura perigonadal e (C) gordura retroperitoneal.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O modelo SL é um modelo que pode ser utilizado para mimetizar a obesidade em ratos, além disso, o uso de metformina durante a adolescência foi capaz de melhorar as alterações metabólicas causadas pela superalimentação precoce, de forma a diminuir o peso corporal e os estoques de gordura visceral. Este estudo mostra a importância de se estudar o período da adolescência.

REFERÊNCIAS

DE BOO, H. A.; HARDING, J. E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [S.l.], v. 46, n. 1, p. 4–14, feb. 2006. ISSN 0004-8666. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16441686>.



PREVIATE, C. et al. Early metformin treatment improves pancreatic function and prevents metabolic dysfunction in early overfeeding male rats at adulthood. **Experimental Physiology**, v. 105, n. 12, p. 2051–2060, dez. 2020. ISSN 1469-445X (Online), 0958-0670 (Print). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33074581>.

PARRA-VARGAS, Marcela et al The long-lasting shadow of litter size in rodents: litter size is an underreported variable that strongly determines adult physiology. **Molecular Metabolism**, [S. l.], v. 71, p. 101707, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2023.101707>.

SANTOS JÚNIOR, J. P.; et al. Plasticidade fenotípica: contexto histórico, teorias e DOHaD. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 4, e37712430688, 2023. DOI: 10.33448/rsd-v12i4.30688.

SOUZA, L. L.; MOURA, E. G.; LISBOA, P. C. Litter size reduction as a model of overfeeding during lactation and its consequences for the development of metabolic diseases in the offspring. **Nutrients**, v. 14, n. 10, p. 2045, 13 maio 2022. DOI: 10.3390/nu14102045. PMID: 35631188.

SISK, C. L.; FOSTER, D. L. The neural basis of puberty and adolescence. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 5, n. 7, p. 1040–1047, 2004.

SPEAR, L. P. The adolescent brain and age-related behavioral manifestations. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 24, n. 4, p. 417–463, 2000.

TOHI, M.; TU'AKOI, S.; VICKERS, M. H. A systematic review exploring evidence for adolescent understanding of concepts related to the developmental origins of health and disease. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 14, n. 6, p. 755-762, dez. 2023. DOI: 10.1017/S2040174423000241.