



DIETA DE RESTRIÇÃO PROTEICO-CALÓRICA DURANTE A LACTAÇÃO CAUSA AUMENTO NA SENSIBILIDADE A INSULINA MATERNA EM RATOS WISTAR (dados preliminares)

João Victor Damin¹; Marcelo Rocengholli Valentim²; Scarlett Rodrigues Raposo³; Claudio Guilherme de Assis Oliveira⁴; Kesia Palma-Rigo⁵; Paulo César de Freitas Mathias⁶.

¹Acadêmico de mestrado em Ciências Fisiológicas; Bolsista CNPq; Membro do laboratório Experimental em DOHaD (LExDOHaD), joao_damin@hotmail.com

²Acadêmico de graduação em Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá; Membro do laboratório Experimental em DOHaD (LExDOHaD), mrvale@outlook.com

³Acadêmica de doutorado em biologia celular e molecular da Universidade Estadual de Maringá; Bolsista CNPq; Membro do laboratório Experimental em DOHaD (LExDOHaD), scarlettrapos@gmail.com

⁴Acadêmico de graduação em medicina da Universidade Estadual de Maringá; Bolsista CNPq; Membro do laboratório Experimental em DOHaD (LExDOHaD), claudioguilherme05@gmail.com

⁵Professora do programa de pós-graduação em Ciências Fisiológicas; Colaboradora do laboratório Experimental em DOHaD (LExDOHaD), kesiapalmarigo@hotmail.fr

⁶Professor sênior do programa de pós-graduação em biologia celular e molecular; Coordenador do laboratório Experimental em DOHaD (LExDOHaD), pmathias@uem.br

RESUMO

A amamentação é um período crítico para a programação metabólica da prole, sendo capaz de influenciar a saúde na vida adulta, conforme descrito pelo conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease). Enquanto muitos estudos abordam os efeitos da restrição proteico-calórica sobre os filhotes, pouco se conhece sobre os impactos maternos nesse período. Este estudo avaliou os efeitos metabólicos agudos de uma dieta com restrição calórico-proteica durante a lactação em ratas Wistar. Fêmeas adultas (n=24), no segundo dia de lactação, foram divididas em grupo Controle (C), alimentado com ração padrão (20,5% de proteína), e grupo Low Protein (LP), alimentado com dieta hipoproteica (4% proteína) até o dia 14 de lactação, seguida de ração padrão até o desmame. Foram avaliados a glicemia de jejum (6h), peso de tecidos adiposos e pâncreas, além de sensibilidade à insulina por teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipITT). Os dados foram processados utilizando o Graphpad Prism, por teste t de student, e foram considerados significativos resultados com $p < 0,05$. O grupo LP apresentou maior taxa de redução da glicose sanguínea no ipITT ($p = 0,0391$), indicando aumento da sensibilidade à insulina. Não houve diferença na glicose de jejum ($p = 0,95$). Observou-se menor peso relativo da gordura uterina nas ratas LP ($p = 0,0357$), enquanto gorduras retroperitoneal, mesentérica e ovariana, assim como o peso pancreático, não diferiram significativamente entre os grupos. Esses resultados sugerem que uma restrição calórico-proteica de curta duração durante a lactação é capaz de modificar parâmetros metabólicos maternos, aumentando a sensibilidade à insulina e reduzindo seletivamente estoques de gordura.

PALAVRAS-CHAVE: DOHaD; Insulina; Lactação; Low-Protein.

1 INTRODUÇÃO

A amamentação desempenha papel essencial para o desenvolvimento da prole de mamíferos e é reconhecida como um dos períodos críticos de programação metabólica dos filhotes (SILVEIRA et al., 2007). Essa fase apresenta potencial tanto para favorecer a formação de um adulto saudável quanto para aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento de síndrome metabólica (PICÓ et al., 2020), conforme estabelecido pelo conceito DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) (BARKER; OSMOND, 1986). Estudos mostram que descendentes de mães submetidas a dieta com baixo teor proteico (LP) durante a gestação e lactação apresentam menor crescimento e peso, redução na concentração sérica de proteínas totais aos 30 dias de idade e elevação da pressão arterial na vida adulta (de BRITO ALVES, 2014). Quando a restrição ocorre apenas no período de lactação, foi observado que as ilhotas pancreáticas dos filhotes exibem



secreção de insulina com resposta à glicose diminuída aos 80 dias, associada a alterações no sistema nervoso autonômico (GRAVENA, 2013).

Grande parte das investigações no contexto do DOHaD concentra-se nos prejuízos causados pela dieta LP à saúde da prole, enquanto os efeitos maternos nesse período são menos explorados. A condição de saúde da mãe influencia diretamente o bem-estar dos filhotes, sendo amplamente documentado que seu estado metabólico antes, durante e após a gestação regula a expressão gênica, o metabolismo e o crescimento saudável da prole. Além disso, tanto o estado nutricional quanto o peso materno durante a lactação estão relacionados à taxa de mortalidade dos filhotes (MARSHAL et al., 2022). Assim, o presente estudo teve como objetivo investigar os efeitos metabólicos agudos de uma dieta com restrição proteico-calórica durante a lactação em ratas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar, criados no biotério central da Universidade Estadual de Maringá. Ratos fêmeas (n=24) entre 80 e 90 dias de vida foram transportados juntos com machos (n=12) para cruzamento, para o Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular da Secreção vinculado ao Departamento de Genética, Biotecnologia e Biologia Celular. Os animais foram mantidos em uma sala controlada, com temperatura constante de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas (7:00-19:00 horas, período claro), com acesso livre à água e ração (Nuvital®, Curitiba, Brasil), e passaram por um período de adaptação de sete dias. Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com as normas do Comitê de Ética para Uso e Experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá. Ao final de 7 dias as ratas foram submetidas ao cruzamento com os machos, em uma proporção por caixa de um macho para duas fêmeas. A partir da confirmação de prenhez das fêmeas, elas foram encaminhadas para caixas individuais.

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O dia do nascimento dos animais foi considerado o dia 0. No dia 1 foi atribuída a devida dieta a rata (*ad libitum*), e no dia 2 foi realizada a padronização das ninhadas para 9 filhotes por mãe. Os animais foram divididos em 2 grupos de 12 fêmeas, totalizando 24 animais: o grupo Controle (C), alimentado com ração comercial padrão Nuvital®; e o grupo Low Protein (LP), alimentado com ração hipoproteica (4% de proteínas). As intervenções dietéticas foram administradas exclusivamente durante a lactação, sendo que no grupo C até o último dia da lactação e o grupo LP apenas até o dia 14, devido a sua alta restrição proteica, sendo a dieta então substituída pela dieta comercial padrão.

2.3 EUTANÁSIA E COLETA DE TECIDOS

A eutanásia foi realizada logo após o período de lactação por rápida decapitação por guilhotina afiada (Insight, Ribeirão Preto) específica para roedores. As gorduras retroperitoneal, mesentérica, ovariana e uterina, e pâncreas foram coletados e pesados.

2.4 TESTE DE TOLERÂNCIA A INSULINA

Após um jejum de 6 horas, todos os animais receberam uma injeção intraperitoneal de insulina (1U/kg PC) para o teste de tolerância a insulina intraperitoneal (ipITT). Foram



obtidas amostras de sangue (75 uL) por meio de tubo capilar heparinizado (75mm de comprimento, 1,5mm de diâmetro externo). O sangue foi obtido por via caudal no tempo 0 (antes da injeção), 15, 30, 45 e 60 minutos após a administração de insulina. As análises dos níveis de glicose sanguínea foram feitas por método enzimático-colorimétrico (GoldAnalisa®; Belo Horizonte, Brasil) usando um espectrofotômetro (Analisador bioquímico semi-automático, BIO 200FL, Bio Plus®, São Paulo/SP, Brasil).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados desse estudo foram processados usando o programa GraphPadPrism 8 (GraphPad softwares, La Jolla, CA, USA). Os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (SEM). Foram considerados significativos os resultados que apresentaram $P < 0,05$. Foi realizado um teste de normalidade seguido de teste t de Student.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A dieta de restrição proteico-calórica foi capaz de causar aumento na porcentagem de redução de glicose sanguínea por minuto ($p=0,0391$) em ratas durante a lactação, como mostra o gráfico do cálculo do KITT (Figura 1B). Esse resultado indica que os animais LP apresentam uma maior sensibilidade a insulina mesmo com o retorno a uma dieta padrão após os 14 dias. O aumento da sensibilidade a insulina pode ter sido causado pela restrição calórica imposta pela dieta. Estudos já demonstraram que uma dieta de restrição calórica é capaz de aumentar a sensibilidade a insulina (WEISS *et al*, 2006). A revisão conduzida por Genaro e colegas (2009) analisou os efeitos da restrição calórica sobre a longevidade, onde destaca a influência dessa intervenção dietética na sensibilidade à insulina, achado que também foi observado no presente estudo. Não houve diferença estatística na glicose de jejum ($p=0,95$) (Figura 1C).

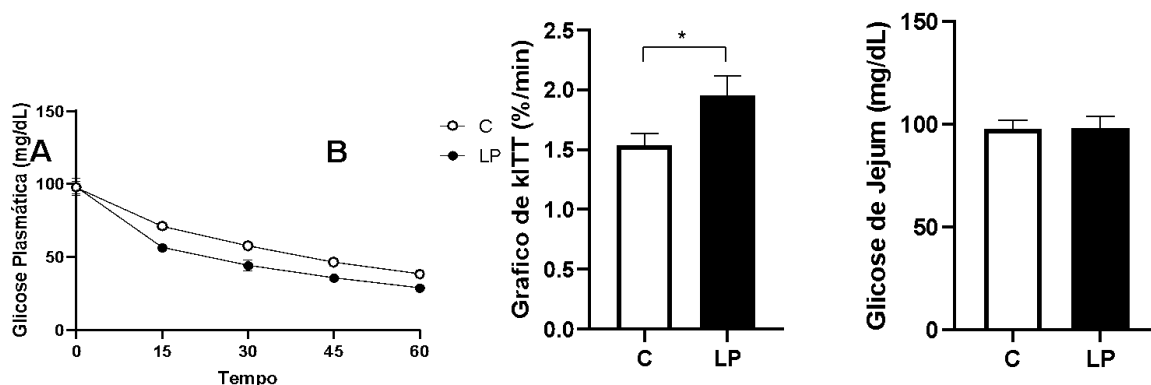


Figura 1 – Gráfico de ipITT e KITT do ipITT e glicemia de jejum.

Nota: Dados expressos em valor de p; média \pm erro padrão da média; número de animais (n). A) Gráfico do Teste de Tolerância a Insulina (C n=7 vs LP n=6) B) KITT do teste de tolerância a Insulina ($p=0,0391$; C $1,539 \pm 0,093$, n=7 vs LP $1,955 \pm 0,158$, n=6); C) Glicemia de jejum (6h) ($p=0,95$; C $97,67 \pm 4,31$, n=7 vs LP $98,03 \pm 5,78$, n=6).

Fonte: Dados preliminares deste projeto.

A gordura uterina do grupo LP apresentou menor peso relativo ($p=0,0357$) quando comparada com os o grupo controle (Figura 2A), porém nas gorduras retroperitoneal ($p=0,65$, Figura 2B), mesentérica ($p=0,461$, Figura 2C) e ovariana ($p=0,914$, Figura 2C) não



foi possível observar diferença significativa. Isso pode ser devido ao tempo limitado em que a dieta LP é administrada, sendo que o retorno da dieta padrão após os 14 dias possa ser capaz de aliviar os efeitos esperados da dieta LP nos estoques de gordura corporal do animal. O peso do pâncreas também foi avaliado, e não apresentou diferença estatística ($p=0,41$, Figura 2D).

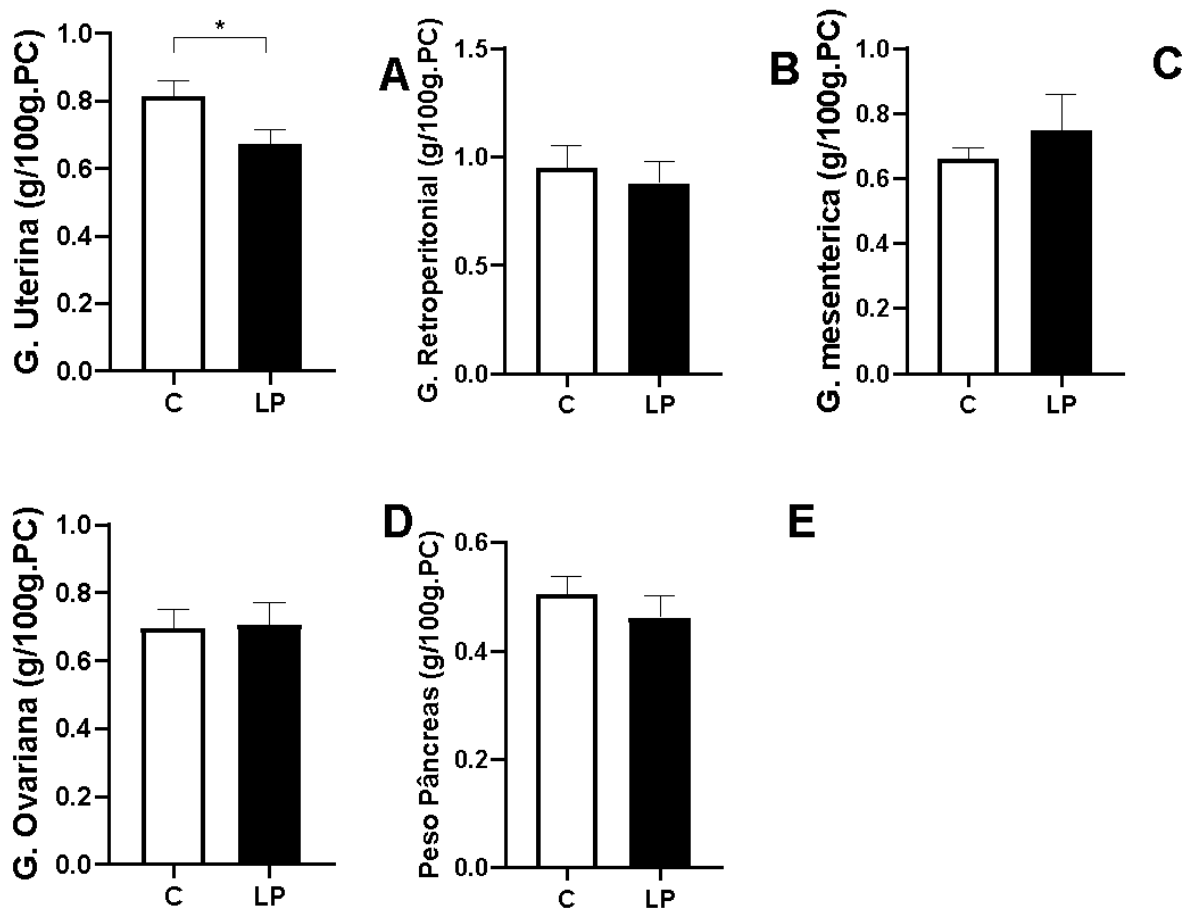


Figura 2 – Peso das gorduras retroperitoneal, mesentérica, uterina e ovariana, e peso de pâncreas relativos a 100g de peso corporal.

Nota: Dados expressos em valor de p; média \pm erro padrão da média; número de animais (n). A) Gordura uterina ($p=0,0357$; C $0,814 \pm 0,04$ vs LP $0,672 \pm 0,04$; $n=8$); B) Gordura retroperitoneal ($p=0,65$; C $0,946 \pm 0,10$ vs LP $0,878 \pm 0,10$; $n=8$); C) Gordura Mesentérica ($p=0,461$; C $0,660 \pm 0,03$ vs LP $0,748 \pm 0,11$; $n=8$); D) Gordura Ovariana ($p=0,914$; C $0,695 \pm 0,05$ vs LP $0,705 \pm 0,06$; $n=8$); E) Peso de pâncreas ($p=0,41$; C $0,505 \pm 0,03$ vs LP $0,461 \pm 0,04$; $n=8$).

Fonte: Dados preliminares deste projeto.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados preliminares apresentados nesse trabalho mostram que a dieta LP durante os primeiros 14 dias de lactação seguida de retorno a dieta padrão causa aumento da sensibilidade a insulina, e redução na gordura uterina, apesar de não causar mudança no peso relativo das gorduras retroperitoneal, mesentérica e ovariana. O peso do pâncreas também não apresentou diferença significativa. Considerando o quão importante a saúde materna é para o desenvolvimento saudável da prole durante os primeiros dias de vida é



imprescindível que mais estudos abranjam também a saúde da mãe dentro do contexto do conceito DOHaD e da dieta LP.

Agradecemos a CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro, às empresas parceiras JBS e INSPAM, ao grupo LExDOHaD, ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PBC-UEM), e à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

1. BARKER, D.J.; OSMOND, C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*. 1(8489) p. 1077-1081. Maio, 1986.
2. SILVEIRA P. P.; PORTELLA A. K.; GOLDANI M. Z.; BARBIERI M. A. Developmental origins of health and disease (DOHaD). *Jornal de Pediatria*. 83, 6. Rio de Janeiro. Dezembro 2007.
3. PICÓ, C.; REIS, F.; EGAS, C.; MATHIAS, P.; MATAFOME, P. Lactation as a programming window for metabolic syndrome. *European Journal of Clinical Investigation*, Vol. 51, n. 5. Dezembro, 2020.
4. DE BRITO ALVES, J. L.; NOGUEIRA, V. O.; OLIVEIRA, G. B. *et al.* Short- and long-term effects of a maternal low-protein diet on ventilation, O₂/CO₂ chemoreception and arterial blood pressure in male rat offspring. *British Journal of Nutrition*. Vol.111, n. 4 p. 606-615. 2014. Disponível em: doi:10.1017/S0007114513002833
5. GRAVENA, C., *et al.* Protein restriction during lactation alters the autonomic nervous system control on glucose-induced insulin secretion in adult rats. *Nutritional Neuroscience*, Vol. 10, n. 1–2, p. 79–87. Setembro, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10284150701308693>.
6. GENARO, P. S.; SARKIS, K. S.; MARTINI, L. A. O efeito da restrição calórica na longevidade *Arq Bras Endocrinol Metab*. Vol 53. n.5. julho, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000500019>
7. MARSHALL, N. E.; ABRAMS, B.; BARBOUR, L. A.; THORNBURG, K. L. *et al.* The importance of nutrition in pregnancy and lactation: lifelong consequences. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Vol. 226, n. 5, p. 607-632. Maio, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2021.12.035>
8. WEISS, E. P., *et al.* Improvements in glucose tolerance and insulin action induced by increasing energy expenditure or decreasing energy intake: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 84, n.5, p. 1033-42. Novembro, 2006. Disponível em: doi: 10.1093/ajcn/84.5.1033.