



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA

EZEQUIEL MOURA DOS SANTOS

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLÍPIDICA PÓS-DESMAME SOBRE
ENZIMAS METABÓLICAS HEPÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
ENFERMAGEM
NÚCLEO DE ENFERMAGEM

EZEQUIEL MOURA DOS SANTOS

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLÍPIDICA PÓS-DESMAME SOBRE
ENZIMAS METABÓLICAS HEPÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

TCC apresentado ao Curso de Graduação
em Enfermagem da Universidade Federal
de Pernambuco, Centro Acadêmico de
Vitória, como requisito para a obtenção do
título de Bacharel em Enfermagem.

Orientador: Prof.(a) Dr.(a) Mariana Pinheiro
Fernandes

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
2019

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Ana Lígia F. dos Santos, CRB4-2005

S237e Santos, Ezequiel Moura dos.

Efeitos de uma dieta hiperlipídica pós-desmame sobre enzimas metabólicas hepáticas de ratos submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação.
/ Ezequiel Moura dos Santos. - Vitória de Santo Antão, 2019.
39 folhas.

Orientadora: Mariana Pinheiro Fernandes.
TCC (Graduação) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV, Bacharelado em Enfermagem, 2019.
Inclui referências e anexos.

1. Fígado. 2. Metabolismo. 3. Dieta Hiperlipídica. I. Fernandes, Mariana Pinheiro (Orientadora). II. Título.

612.39 CDD (23. ed.)

BIBCAV/UFPE-221/2019

EZEQUIEL MOURA DOS SANTOS

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLÍPIDICA PÓS-DESMAME SOBRE
ENZIMAS METABÓLICAS HEPÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À
RESTRIÇÃO PROTEICA DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO**

TCC apresentado ao Curso de Graduação
em Enfermagem da Universidade Federal
de Pernambuco, Centro Acadêmico de
Vitória, como requisito para a obtenção do
título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: 18 / 11 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Mariana Pinheiro Fernandes (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Sueli Moreno Senna (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profº. Dr. Juliana Souza Oliveira (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Esp. Aiany Cibelle Simões Alves (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Pela conclusão deste trabalho, gostaria de agradecer primeiramente a Deus por ter me dado tudo que sempre precisei para alcançar este objetivo.

À minha família e a todos os meus amigos de verdade eu quero que saibam que reconheço tudo que fizeram por mim, a força que incutiram no meu pensamento para não desistir e o conforto de saber que nunca estarei só e serei sempre capaz de tudo, por maiores que sejam as dificuldades.

A Minha Orientadora Profa. Dra. Mariana Pinheiro Fernandes eu deixo um agradecimento gigante, porque sem essa paciência e sabedoria eu jamais seria esta pessoa tão realizada. Admiro muito sua forma de trabalhar, nortear e conduzir seus alunos, muito obrigada por tudo professora!

Ninguém nasce feito,
é experimentando-nos no mundo que nós nos fazemos.

Paulo Freire

RESUMO

A gestação e a lactação são consideradas fases críticas do desenvolvimento da prole e mudanças na nutrição materna podem levar a predisposição inerente de doenças crônico-metabólicas para a progênie. Nesse contexto, tem sido demonstrado que o fígado, órgão principal no controle do metabolismo de carboidratos e lipídios, mostra-se bastante sensível a alterações nutricionais. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar alterações metabólicas em fígado de ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame. Foram utilizadas 30 ratas albinas primíparas da linhagem Wistar, aos 90 dias de vida. Após confirmação da prenhez foi ofertada uma dieta normoproteica (grupo NP) ou hipoprotéica (grupo HP) até o final da lactação. Após o desmame, os filhotes dos grupos NP e HP receberam até os 90 dias de vida: dieta normolipídica-NL, formando os grupos NPNL e HPNL; ou dieta hiperlipídica- HL, formando os grupos NPHL e HPHL. Foram avaliados o peso corporal e do fígado, dosagem sérica de albumina e aminotransferases (Kit da Labtest), atividade das enzimas fosfostrutoquinase 1 (PFK), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), citrato sintase, β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β -Had) e ácido graxo sintase (FAS). A comparação entre os grupos foi feita por ANOVA two way considerando $p < 0,05$. Observou-se que os ratos não apresentaram alteração no peso corporal e no peso do fígado quando comparados ao grupo controle (NPNL). Foi verificado também, que não houve diferença significativa nos níveis séricos de albumina e aminotransferases entre os grupos. Não houve diferença entre os grupos em relação à atividade da PFK, porém, houve uma redução significativa na atividade da enzima G6PDH entre os grupos NPNL vs NPHL; NPNL vs HPNL e um aumento quando comparado HPNL vs HPHL. Também observou-se um aumento significativo na atividade da enzima β -Had entre os grupos NPNL vs NPHL, e NPNL vs HPHL, como também na atividade da enzima citrato sintase comparando NPNL vs HPNL e NPNL vs HPHL e um aumento na atividade da FAS entre os grupos NPNL vs HPHL, HPNL vs HPHL, e NPHL vs HPHL. Nossos resultados mostraram que ratos submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação seguida de uma dieta hiperlipídica pós-desmame apresentaram um aumento do metabolismo lipídico com maior utilização de ácidos graxos como substrato energético e maior atividade do ciclo de Krebs, como uma forma de readaptação metabólica aos insultos sofridos.

Palavras-chave: Fígado. Insultos Nutricionais. Metabolismo.

ABSTRACT

Pregnancy and lactation are considered critical phases of offspring development and changes in pregnant woman nutrition may lead to inherent predisposition of chronic metabolic diseases to progeny. The aim of this work was evaluate metabolic alterations in liver of adult rats submitted the hypoproteic diets during pregnancy and lactation and post weaning hyperlipidic. Were used thirty albino female rats primiparous from wistar family at 90 days of age after confirmation of pregnancy, a normoprotein (NP group) or hypoprotein (HP group) diet was offered until the end of lactation. After weaning, the male rats of the groups NP and HP received until 90 days of age: NL-normolipidic diet, forming the groups NPNL and HPNL; or HL- hyperlipidic diet, forming the groups NPHL and HPHL. Were assessed body weight and liver, serum albumin and aminotransferase levels, activity of the enzymes phosphostrutokinase 1 (PFK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), citrate synthase, β -hydroxycil-CoA dehydrogenase (β -Had) and fat acid synthase (FAS). The comparison between the groups was made by two-way ANOVA considering $p < 0.05$. It was observed that the rats showed no change in body weight as well as liver weight when compared with control group (NPNL). It was found that there was no significant difference in serum albumin levels, as well as on the aminotransferase levels between groups. There was no difference between groups regarding PFK activity, however, there was a significant reduction in G6PDH enzyme activity between NPNL groups and NPHL (46%, $p = 0.009$); NPNL vs HPNL (54%, $p = 0.0008$) and an increase when compared to HPNL vs HPHL (96%, $p = 0.01$). There was also a significant increase in β -Had enzyme activity between the NPNL vs NPHL (3.5 times, $p = 0.003$) and NPNL vs HPHL groups (3 times, $p = 0.011$), as well as in citrate synthase activity comparing NPNL vs HPNL (2 times, $p = 0.048$) and NPNL vs HPHL (2 times, $p = 0.04$). It was observed an increase FAS activity between groups NPNL vs HPHL, (2 times, $p < 0.0001$), HPNL vs HPHL, (3 times, $p = 0.003$) and NPHL vs HPHL, (3.5 times, $p = 0.029$). Rats subjected to protein restriction during pregnancy and lactation followed by a post-weaning hyperlipidic diet show increase of lipid metabolism, with higher use of fatty acids as energy substrate and greater Krebs cycle activity, as a form of metabolic readaptation to the insults suffered.

Key words: Liver. Nutritional Insults. Metabolism.

LISTA DE ABREVIATÖES

AMP - Adenosina Monofosfato

ATP - Adenosina Trifosfato

BSA - Albumina de soro bovino

CoA - Conezima A

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

DTNB - 5,5'-Ditiobis- (ácido 2-nitrobenzóico)

DTT - 1,4-Dithiothreitol

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

FAS - Ácido graxo sintase

G6PDH - Glicose 6- fosfato desidrogenase

H₂O - Água

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Kcal- Quilocaloria

Mg – Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

Min - Minuto

mL - Mililitro

mM - Milimolar

NADH - Nicotinamida Adenina Dinuclotídeo (estado reduzido)

NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)

PFK-1 - Fosfofrutoquinase - 1

pH - Potencial hidrogeniônico

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonila

UFPE - Universidade Federal de Pernambuco

β-HAD - β – hidroxiacil - CoA – desidrogenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 PLASTICIDADE FENOTÍPICA.....	12
2.2 NUTRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO	12
2.3 MUDANÇAS NO PADRÃO ALIMENTAR.....	13
2.4 FIGADO E METABOLISMO	14
2.5 DESNUTRIÇÃO PROTEICA E DIETA HIPERLÍPIDICA NO FÍGADO	15
3 OBJETIVOS	17
3.1 OBJETIVO GERAL.....	17
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 ANIMAIS E DIETAS	18
4.1.1 Critérios de inclusão	19
4.1.2 Critérios de exclusão	19
4.3 COLETA DOS TECIDOS PARA POSTERIORES ANÁLISES.....	19
4.4 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E PESO DO FÍGADO	19
4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ALBUMINA E AMINOTRANSFERASES (ALANINA E ASPARTATO AMINOTRANSFERASES).....	19
4.6 PREPARO DO HOMOGENEIZADO DO TECIDO HEPÁTICO PARA UTILIZAÇÃO NAS TÉCNICAS BIOQUÍMICAS.....	20
4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA	20
4.8 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO FÍGADO	20
4.9 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS NO FÍGADO	21
4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO CICLO DE KREBS NO FÍGADO	22
4.11 ANÁLISE DOS DADOS	22
5 RESULTADOS	23
6 DISCUSSÃO	29
REFERÊNCIAS.....	33
ANEXO A - ARTIGO A SER SUBMETIDO AO BRAZILIAN JOURNAL OF NUTRITION.....	38

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, milhares de pessoas, em sua maioria crianças, morrem anualmente ou apresentam um retardo no desenvolvimento fisiológico devido a deficiências nutricionais. Em muitos casos, estes problemas estão relacionados a modificações no ambiente perinatal (durante gestação e amamentação), repercutindo em baixo peso ao nascer e a deficiência nutricional (WHO, 2014; FAO, 2015). As relações entre saúde e dieta demonstram que dependendo do estado nutricional do indivíduo ocorre uma maior predisposição ao aparecimento e/ou progressão de processos patológicos (GLUCKMAN; HANSON, 2004).

Nessa perspectiva, as alterações no estado nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento dos indivíduos podem levar ao surgimento e progressão de doenças metabólicas ao longo da vida, tais como, diabetes tipo II, obesidade e hipertensão arterial. Para Barker, em sua hipótese da "origem desenvolvimentista da saúde e da doença", os hábitos alimentares e condições nutricionais nas primeiras fases da vida podem desempenhar um papel fundamental na etiologia dessas doenças induzindo alterações metabólicas e/ou fisiológicas, por promover mudanças no ambiente fetal, que podem desencadear alterações genéticas e refletir na maturação de órgãos e sistemas fetais. A gestação e a lactação são consideradas fases críticas do desenvolvimento da prole e mudanças no processo de nutrição materna podem levar a predisposição inerente de doenças para a progênie (BARKER, 1990, 1993, 1997, 1998, 1999, 2000, 2007).

A partir da segunda metade do século XX, os altos índices de desnutrição vem sendo substituídos por índices cada vez mais elevados de sobrepeso e obesidade (DI PIETRO *et al.*, 2015), relacionados à mudança nos hábitos alimentares da população mundial, principalmente ocidental, o que tem sido chamado de fenômeno da "transição nutricional" (HASAN *et al.*, 2016; HERRAN; PATINO; DEL CASTILLO, 2016). Comprovadamente, o tradicional comportamento nutricional de comer e viver bem vem sendo substituído por uma forma mais rápida de se alimentar, os famosos "*Fast Foods*" (HASAN *et al.*, 2016).

No mundo, estima-se que cerca de quarenta milhões de crianças menores de cinco anos já apresentem problemas metabólicos decorrentes de uma dieta rica em

açúcares e gorduras (RIBEIRO *et al.*, 2015). Ainda, dados revelam que no Brasil, o consumo de uma dieta rica em gordura contribuiu para duplicar os índices de gordura corporal na população da região Sudeste e para triplicar na região Nordeste (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003)

Neste contexto, tem sido demonstrado que o fígado, órgão principal no controle do metabolismo de carboidratos e lipídios, é mais sensível a alterações nutricionais, como aquelas induzidas pela desnutrição proteica (RUI, 2014). Alterações na fisiologia hepática antecedem as alterações que possam ocorrer em outros órgãos envolvidos no controle metabólico (JAHAN-MIHAN *et al.*, 2015). Pesquisas recentes demonstram que ratos expostos a uma dieta rica em gordura durante a infância e adolescência apresentam, na vida adulta, um aumento da glicemia e insulinemia de jejum, resistência a insulina, elevada secreção de insulina pelas células beta pancreáticas, bem como aumento do peso corporal e depósitos de gordura (BARELLA *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2013).

De fato, a desnutrição proteica materna é capaz de induzir no fígado da prole, aumento no tamanho dos lóbulos (AMORIM *et al.*, 2009), alteração no metabolismo de carboidrato e lipídios (BALLEN *et al.*, 2009), esteatose hepática (ERHUMA *et al.*, 2007), redução de cristas mitocondriais (RAMADAN; ALSHIRAIHI; AL-KARIM, 2013), além de modificações na expressão de mRNA de enzimas envolvidas na glicogênese, glicogenólise e glicólise, e na sensibilidade à insulina (PARK *et al.*, 2003).

Além disso, estudos de Brito-Alves *et al.* (ALVES, 2016) mostraram que aos 90 dias de vida, o fígado de animais submetidos à dieta hipoproteica durante gestação e lactação tem maior expressão da enzima ácido graxo sintase (FAS) e menor expressão da enzima β -hidroxiacil-CoA desidrogenase (β HAD), o que sugere um aumento da capacidade de produção de ácidos graxos, entretanto, menor capacidade de metabolizá-lo a acetil-CoA para produção de coenzimas reduzidas NADH e FADH₂. Além de alterações cardiovasculares induzidas por dietas hiperlipídicas, tem sido evidenciado que ela pode induzir uma alteração no metabolismo de carboidratos e lipídios, resultando em: maior deposição de gordura; aumento nos níveis séricos de triglicerídeos, colesterol e alanina aminotransferase (ALT); e acúmulo de

triglicerídeos e colesterol no fígado (LEE *et al.*, 2016). Parte destes efeitos parece estar associada a alterações na expressão de genes envolvidos no metabolismo de carboidratos e lipídios, tais como aumento da expressão das enzimas FAS e G6Pase (HOU *et al.*, 2016) e diminuição na β -oxidação de ácidos graxos e nas enzimas palmitoilcarnitina I (CPT I) e acil-CoA oxidase (ACO) (LU *et al.*, 2014). Além disso, as vias de sinalização da insulina parecem ser afetadas pela dieta, levando a alterações metabólicas importantes (HENRIKSEN *et al.*, 2008; KAHLE *et al.*, 2015). Desta forma, nossa hipótese é que ratos submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação seguida de uma dieta hiperlipídica pós-desmame apresentam prejuízo no metabolismo de carboidratos e lipídios no fígado, aos 90 dias de vida.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PLASTICIDADE FENOTÍPICA

A plasticidade fenotípica refere-se à capacidade de um organismo reagir a mudanças no meio com alteração da forma, estado, movimento, ou taxa de atividade, sem alterações genéticas (WEST-EBERHARD, 2005). Uma das variações mais bem documentadas no estudo da plasticidade fenotípica é a nutrição. Nesse sentido, a falta ou o aumento do aporte nutricional durante períodos críticos do desenvolvimento podem resultar em alterações permanentes na estrutura e função de órgãos e predispor o desenvolvimento de doenças relacionadas a alterações metabólicas (ALVES; NOGUEIRA *et al.*, 2014).

Desta forma, o aporte inadequado de nutrientes durante a vida fetal tem sido associado ao baixo peso ao nascer e déficits durante o crescimento e a maturação. Podendo ainda ocorrer alterações na atividade do miocárdio, atraso na aquisição dos padrões normais da atividade locomotora e deficiência nas propriedades contráteis e elásticas do músculo esquelético de ratos adultos, como também, promove alterações estruturais e fisiológicas hepática (aumento de tamanho do lóbulos), (ARRUDA *et al.*, 2017), como hipertrofia hepática que pode estar relacionada a alterações no estado oxidativo, esteatose hepática e diabetes (HARRIS *et al.*, 2018; FALCÃO-TEBAS *et al.*, 2012).

2.2 NUTRIÇÃO E DESENVOLVIMENTO

As exposições nutricionais da primeira vida, combinadas com mudanças no estilo de vida na fase adulta, podem resultar em maior risco de doenças crônicas (BIOSCA *et al.*, 2011). Embora grande parte do foco de estudos sobre as origens do desenvolvimento de doenças tenha sido sobre o tamanho do nascimento, o crescimento na vida pós-natal e a disponibilidade de energia e proteína durante esses períodos críticos de desenvolvimento, as deficiências de micronutrientes também podem desempenhar um papel importante no crescimento e desenvolvimento fetal (AMORIM *et al.*, 2009).

Estudos em animais de laboratório mostram que o consumo de uma dieta hiperlipídica ocidentalizada, caracterizada por alto índice de gorduras saturadas, aumenta os fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiometabólicas

(CAVALCANTE *et al.*, 2014). Tem sido descrita uma série de repercussões negativas da dieta hiperlipídica/hipercalórica sobre o sistema cardiovascular (SANTOS *et al.*, 2008).

A restrição protéica e a prenhez quando associadas podem desencadear alterações no organismo materno, manifestada por relativo aumento de ácido graxos e menor responsividade à insulina, o que pode minimizar o impacto do inadequado suprimento protéico para o crescimento fetal (BALLEN *et al.*, 2009). Estudos abordando os efeitos da desnutrição durante a prenhez e a lactação, têm relatado ocorrer comprometimento na massa corporal das mães, com repercussões na prole, como alterações permanentes nos indicadores somáticos de crescimento (peso Corporal) e no metabolismo, mudanças irreversíveis no tamanho e na função de órgãos, especialmente no tecido hepático, na composição corporal e na secreção de hormônios que atuam no crescimento fetal (SCHULER *et al.*, 2008).

2.3 MUDANÇAS NO PADRÃO ALIMENTAR

Por meio de uma dieta adequada no cotidiano, o organismo adquire a energia e os nutrientes necessários para o bom desempenho de suas funções e para o equilíbrio de um bom estado de saúde. Desta forma, conhecem-se as consequências decorrentes quer do consumo alimentar insuficiente - deficiências nutricionais - quer do consumo alimentar excessivo - obesidade (MONDINI *et al.*, 2015). De acordo com a OMS (2015), o número global de crianças e adolescentes obesas ou acima do peso aumentou de 32 milhões em 1990 para 42 milhões em 2013. Somente na África, o número de crianças obesas ou acima do peso subiu de 4 para 9 milhões durante o mesmo período. Se as tendências atuais continuarem, o número de crianças com excesso de peso em todo o mundo aumentará para 70 milhões até 2025.

Segundo pesquisas do IBGE de 2010, os brasileiros ganharam peso nos últimos anos. O percentual de homens com excesso de peso subiu de 18,5% para 50,1%; entre as mulheres, a quantia saltou de 28,7% para 48%. Este contexto está ligado ao processo de transição nutricional que corresponde às mudanças de padrões nutricionais de populações, essencialmente determinadas por alterações na estrutura da dieta e na composição corporal dos indivíduos, resultando em

importantes modificações no perfil de saúde e nutrição (DE SOUZA, 2010). O padrão central de transição epidemiológica brasileira configura-se o modelo semelhante de transição nutricional, no qual a coexistência de obesidade e subnutrição passa ser um fato marcante observado na sociedade, principalmente, nas três últimas décadas (HASAN *et al.*, 2016; HERRAN *et al.*, 2016).

2.4 FIGADO E METABOLISMO

O fígado é um órgão essencial e realiza várias atividades vitais, como metabolização, síntese e armazenamento (VOET *et al.*, 2014). Este órgão desempenha muitas funções importantes dentro de nosso organismo, como: metabolismo de macromoléculas (carboidratos, lipídios e proteínas), como também, no processamento de fármacos e hormônios, destruição das células sanguíneas não funcional, emulsificação da gordura durante o processo de digestão através da secreção da bile (TREFTS; GANNO; WASSERMAN, 2017).

A – Metabolismo dos Carboidratos – a glicose extraída do bolo alimentar é armazenada no fígado sob a forma de glicogênio, que será posto à disposição do organismo conforme seja necessário (VOET *et al.*, 2014).

B- Glicogenólise é a quebra ou degradação do glicogênio com posterior transformação em glicose e ocorre graças à ação da enzima glicose-6-fosfatase que se encontra presente nas membranas do retículo endoplasmático liso (NELSON; COX, 2014).

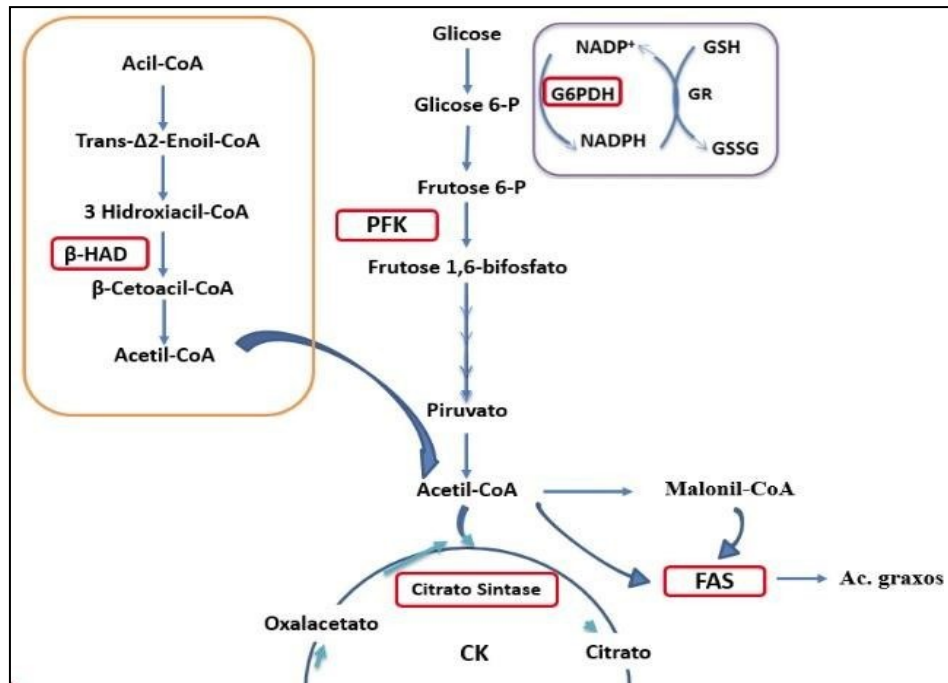
C – Metabolismo dos Lipídios – a célula hepática é responsável pela lipogênese, uma vez que sintetiza lipoproteínas, triglicérides, colesterol e fosfolipídios, que são os componentes essenciais das membranas plasmáticas e também usam colesterol para a produção da bile, substância química com capacidade digestiva (HENRY *et al.*, 2003).

D – Metabolismo das Proteínas – As funções mais importantes desse metabolismo são a desaminação e interconversão de aminoácidos e a formação de ureia (VOET *et al.*, 2014).

Desta forma, é importante destacar que as diversas vias metabólicas hepáticas relacionam-se entre si de forma complexa, de modo a permitir uma

regulação adequada (Figura 1). No qual, envolve a regulação enzimática de cada uma das vias, o perfil metabólico característico de cada órgão e controle hormonal (HALPERN, 1997).

FIGURA 01 - VIAS METABÓLICAS



Adaptado de <http://w.educa.aragob.es/i>

escarin/depart/biocio/varios/aBiologiaCurtis/Seccion %202/8-21.jpg. Acesso em 09/11/2019,

2.5 DESNUTRIÇÃO PROTEICA E DIETA HIPERLÍPIDICA NO FÍGADO

O estado dos micronutrientes na vida fetal e precoce pode alterar o metabolismo, a vasculatura e o crescimento e função dos órgãos, levando a um risco aumentado de transtornos cardiometabólicos, adiposidade, função renal alterada, diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, como também alterações hepática (RIBEIRO *et al.*, 2015).

O peso ao nascer é considerado um sinônimo de crescimento fetal e maturação de órgão e pode refletir um problema relacionado ao desenvolvimento de doenças ao longo da vida. Nesse contexto, a desnutrição proteica materna durante a gestação e a lactação está associada a um permanente déficit de crescimento na prole, expresso como um menor peso e medidas de crescimento corporal,

associados a uma anormalidade no tamanho de órgãos principalmente no fígado (FIDALGO *et al.*, 2013; QASEM *et al.*, 2012).

Tem sido observado também que o ambiente nutricional perinatal durante períodos considerados “sensíveis” de desenvolvimento ou em lactente afeta o crescimento normal/desenvolvimento e isto pode ser associada à doenças crônicas na vida adulta, incluindo hipertensão, síndrome metabólica e diabetes. (MARTIN *et al.*, 2012).

Diante disso, estudos que avaliem alterações metabólicas decorrentes de variações nutricionais durante períodos críticos do desenvolvimento são importantes uma vez que permitem uma melhor compreensão de mecanismos associados ao surgimento e/ou progressão de doenças crônico-metabólicas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar alterações metabólicas em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame, como provável mecanismo subjacente ao aparecimento de doenças metabólicas na vida adulta.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar em ratos adultos (90 dias) submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame:

- Peso corporal e peso do fígado;
- Níveis séricos de albumina e de aminotransferases (ALT e AST);
- Atividade de enzimas chave do metabolismo de carboidratos no fígado: Fosfofrutoquinase 1 (PFK 1) e glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH);
- Avaliar a capacidade metabólica, através da atividade de enzimas chaves do metabolismo de lípidios no fígado: β -hidroxiacil-CoA (β -Had) desidrogenase e ácido graxo sintase (FAS);
- Avaliar a atividade de uma enzima chave do ciclo de Krebs no fígado: Citrato Sintase.

4 METODOLOGIA

4.1 ANIMAIS E DIETAS

Foram utilizadas 30 ratas albinas primíparas da linhagem *Wistar*, 80 a 90 dias de vida, com peso corporal compreendido entre 220 e 260 g e seus filhotes machos (n=60), provenientes do biotério do Centro Acadêmico de Vitória (CAV) da Universidade Federal de Pernambuco. Os protocolos e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso Animal (CEUA) da UFPE (nº 23076.016634/2017-52). As ratas virgens foram acasaladas com ratos machos na proporção de 3:1. Após a confirmação da prenhez foi ofertada uma dieta normoprotéica (grupo NP; 17% de proteína) ou hipoprotéica (grupo HP; 8% de proteína) até o final da lactação. Após o nascimento dos filhotes, a prole foi reduzida para oito filhotes por rata. Após o desmame, os filhotes dos grupos NP e HP receberam: i) a dieta NL, formando os grupos NP-NL e HP-NL; ou a dieta hiperlipídica HL, formando os grupos NP-HL e HP-HL. Todos os quatro grupos permaneceram em suas respectivas dietas até os 90 dias de vida, quando foram realizadas as avaliações.

As dietas controle, hipoproteica e hiperlipídica foram preparadas no Laboratório de Técnica Dietética – CAV – UFPE, de acordo com o American Institute of Nutrition – (AIN-93) (REEVES; NIELSEN; FAHEY, 1993) e o Levantamento de Orçamento Familiar (para preparo da dieta hiperlipídica; IBGE/Brasil, SFB 2002/2003) (CARVALHO *et al.*, 2013). A dieta controle contém em %kcal, 17% de proteínas, 18% de lipídeos (26% de ácidos graxos saturados, 12% monossaturados e 62% poli-insaturados) e 63% de carboidratos, desse modo, fornecendo 3.6kcal/g. A dieta hipoprotéica contém em %kcal, 8% de proteínas, 18% de lipídeos (26% de ácidos graxos saturados, 12% monossaturados e 62% poli-insaturados) e 74% de carboidratos, fornecendo 3.6kcal/g. Por sua vez, a dieta hiperlipídica contém em %kcal, 17% de proteínas, 32% de lipídeos (68% de ácidos graxos saturados, 16% monoinsaturados e 16% poli-insaturados) e 49% de carboidratos, desse modo, fornecendo 4.2 kcal/g, como descrito previamente (FERRO CAVALCANTE *et al.*, 2013).

4.1.1 Critérios de inclusão

Foram incluídas as ratas albinas fêmeas, da linhagem Wistar 80 a 90 dias de vida, com peso corporal compreendido entre 220 e 260 g e seus filhotes machos.

4.1.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas as ratas albinas fêmeas que morressem durante o experimento.

4.3 COLETA DOS TECIDOS PARA POSTERIORES ANÁLISES

Todos os animais foram eutanasiados e submetidos à cirurgia para a remoção do tecido hepático.

4.4 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL E PESO DO FÍGADO

Os animais foram pesados antes da eutanásia em balança específica. Após a eutanásia, o fígado foi removido e pesado.

4.5 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE ALBUMINA E AMINOTRANSFERASES (ALANINA E ASPARTATO AMINOTRANSFERASES)

Para avaliação dos níveis séricos de albumina e aminotransferases foram coletadas amostras de sangue após a decapitação. As análises bioquímicas foram realizadas por Kits colorimétricos da Labtest® (Labtest Diagnóstica SA, MG, Brasil) e analisado em espectrofotômetro.

4.6 PREPARO DO HOMOGENEIZADO DO TECIDO HEPÁTICO PARA UTILIZAÇÃO NAS TÉCNICAS BIOQUÍMICAS

O tecido hepático foi homogeneizado em tampão de extração (Tris base 100 mM; pH 7,5; EDTA 10 mM; ortovanadato de sódio 1 mM; PMSF 2 mM). Após a homogenização as amostras foram centrifugadas a 1180g a 4° C, por 10 minutos e os sobrenadantes foram submetidos à quantificação de proteína.

4.7 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD *et al.*, 1976). O princípio do método baseia-se na determinação da concentração de ligações peptídicas através da medida da absorbância do complexo proteína-corante. Este complexo absorve em comprimento de onda de 595 nm. A absorbância é considerada diretamente proporcional à concentração de proteína na solução analisada, onde uma solução de BSA a (2mg/mL) foi utilizada como padrão.

4.8 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS NO FÍGADO

Atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK1): A atividade máxima da enzima foi determinada segundo método descrito por Opie e Newsholme (OPIE; NEWSHOLME, 1967). O sistema de reação consiste de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), $MgCl_2$ 5 mM, EDTA 1,0 mM, mercaptoetanol 5 mM, $NADH^+$ 13 mM, ATP 20mM, AMP 10 mM, aldolase 5 mM, glicose-6-fosfato desidrogenase 5 mM e triose-fosfato- isomerase 5mM, ao qual foi adicionada a amostra em um volume total de 0.25mL. O ensaio foi iniciado pela adição do substrato (frutose-6-fosfato, 1mM) e as determinações enzimáticas realizadas a 25°C, por 10 min, a 340 nm em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína .

Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH): A atividade máxima foi avaliada pelo método descrito por Bergmeyer *et al.* (BERGMEYER; MOELLERING,

1965). O sistema de reação enzimático continha Tris-HCl 86 mM, MgCl₂ 6.9 mM, NADPH + 0.4 mM, glicose-6-fosfato 1.2 mM, Triton X-100 0.05 % (v/v), pH 7.6. Foi adicionado ao sistema de reação, 0.08 mg de proteína total e o ensaio iniciado pela adição do substrato (glicose-6-fosfato). As determinações enzimáticas foram realizadas a 25°C, por 4 min, a 340 nm em um volume final de 0.25mL, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.9 AVALIAÇÃO DO METABOLISMO DE LIPÍDIOS NO FÍGADO

Atividade da β -hidroxyacil-CoA desidrogenase (β -HAD): A atividade da β -HAD foi determinada segundo Ito *et al.* (ITO *et al.*, 2010). Sua atividade foi avaliada em espectrofluorímetro a um comprimento de onda de 340nm. Preparou uma solução de Imidazol a 50 mM, depois uma solução Mix de Reação (Imidazol 50mM + EDTA 12mM + NADH 0,018mM) da seguinte maneira: o EDTA foi diluído em 30 mL de solução de Imidazol e em seguida a solução calibrada em pH=7,4, para posterior adição de NADH. Após essa etapa a solução foi somada a tampão de extração e amostra, aquecido por 1 min e adicionado Acetil CoA 0,1mM para iniciar a reação e efetuar a leitura da absorbância em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

Atividade ácido graxo sintase (FAS): A atividade da ácido graxo sintase foi medida seguindo a diminuição na absorbância a 340 nm, 25°C, resultante da oxidação de NADPH dependente da adição de malonil-CoA. Cada reação continha 0,1 M de fosfato de potássio, 0,025 mM de acetil-CoA, 0,18 mM de NADPH, 3 mM de EDTA, 1 mM de DTT e 24 mg de albumina. A reação foi iniciada pela adição do substrato da enzima e a leitura realizada em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). (GOODRIDGE, 1973). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO CICLO DE KREBS NO FÍGADO

Atividade da citrato sintase: A atividade máxima da enzima foi determinada segundo Alp *et al.* (ALP *et al.*, 1976) a partir da quantificação do complexo formado entre a CoA liberada com o DTNB do meio. O tampão de ensaio foi contido de Tris- aminometano 50mM, EDTA 1 mM, DTNB 0,2 mM, acetil CoA 0,1 mM, oxaloacetato 0,5 mM e Triton X-1000,05% (v/v) pH 8,1. A reação foi iniciada pela adição de oxaloacetato ao meio e a atividade enzimática foi realizada a 25°C, por 10 min, a 412 nm, em espectrofluorímetro modelo FLUOstar Omega (BMG Labtech, USA). Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

4.11 ANÁLISE DOS DADOS

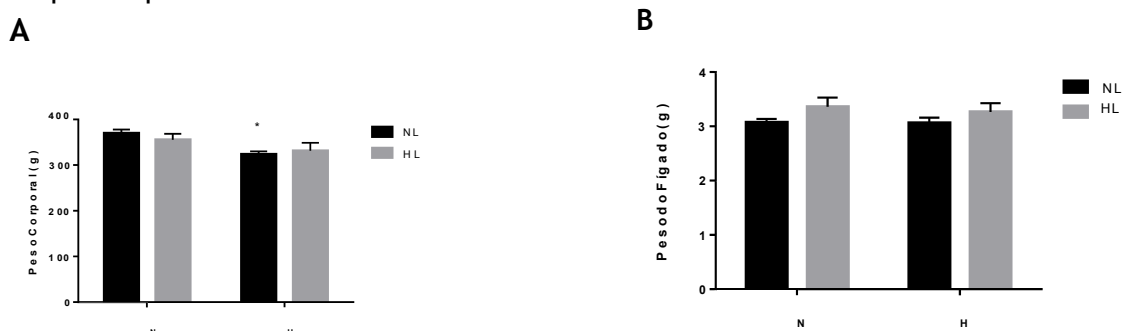
Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). A análise de normalidade da amostra foi realizada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. A comparação entre os dados dos grupos foi realizada por meio da ANOVA two way, seguida, quando necessário, pelo teste de Newman-Keuls. Os dados foram analisados através do programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 5.0, 2007). O nível de significância foi considerado quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Avaliação do peso corporal e peso do fígado em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame

Observamos que ratos submetidos à desnutrição proteica durante gestação e lactação e a uma dieta hiperlipídica pós desmame não apresentaram alteração no peso corporal (Fig. 1A), assim como no peso do fígado quando comparados ao grupo controle (NPNL). Ao compararmos os grupos NPNL vs HPNL, observou-se uma diminuição no peso corporal dos animais desnutridos durante a gestação e lactação (NPNL: 370,30g $\pm$ 7,87 vs HPNL: 324,08g $\pm$ 6,569) (Fig. 1 B).

Figura 1 - Avaliação do peso corporal (A) e peso do fígado (B) em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame.

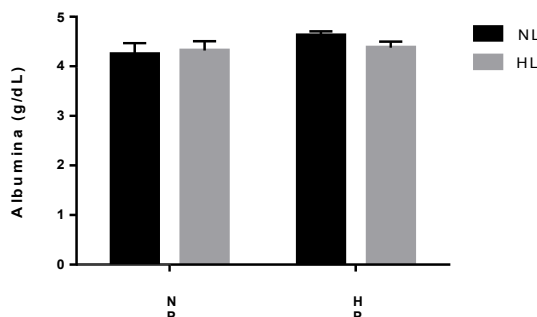


Os valores, em g, representam a média $\pm$ erro padrão da média (*p<0,05 em relação ao grupo NPNL). n=11 animais para cada grupo experimental.

Avaliação dos níveis séricos de albumina e aminotransferases (ALT e AST) em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame

Não foi observada diferença significativa entre os grupos analisados, em relação aos níveis séricos de albumina, em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame (Fig.2).

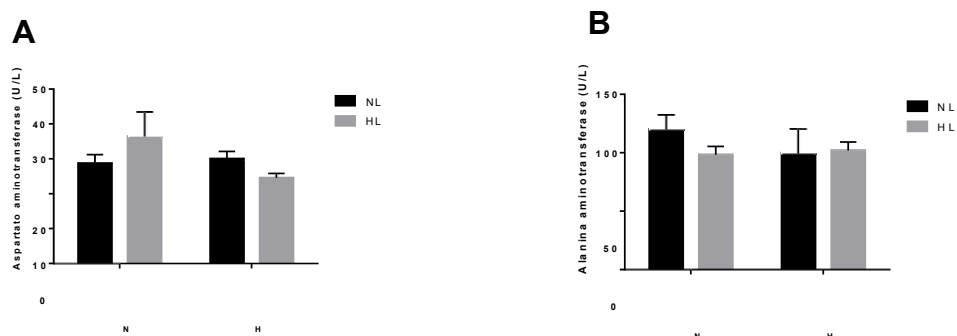
Figura 2 - Efeitos de uma dieta hiperlipídica pós-desmame sobre os níveis séricos de albumina em ratos adultos submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame.



Os valores, em g, representam a média $\pm$ erro padrão da média. n=10-12 animais para cada grupo experimental.

Em relação aos níveis séricos de AST e ALT não foram observadas alterações significativas entre os grupos (Fig. 3).

Figura 3 - Efeitos de uma dieta hiperlipídica pós-desmame sobre os níveis séricos de AST (A) e ALT (B) em ratos adultos submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame.

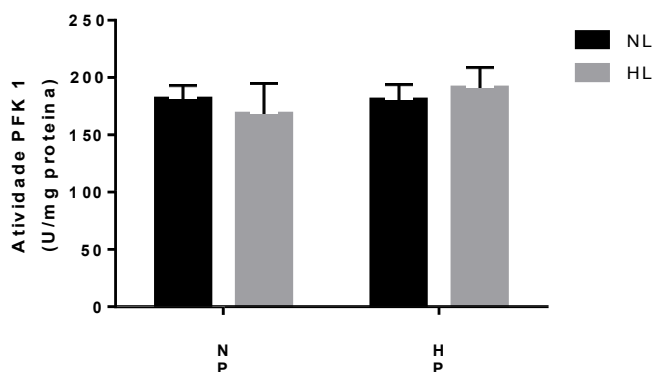


Os valores, em U/L, representam média $\pm$ erro padrão da média. n=10-12 animais para cada grupo experimental.

Avaliação da atividade da Fosfofrutoquinase 1 (PFK 1) em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame

Nossos resultados não apresentaram diferenças significativas na atividade da Fosfofrutoquinase 1 (PFK 1) entre os grupos avaliados (Fig. 4).

Figura 4 - Atividade da fosfofrutoquinase 1 (PFK 1) em fígado de ratos adultos submetidos uma dieta hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame.

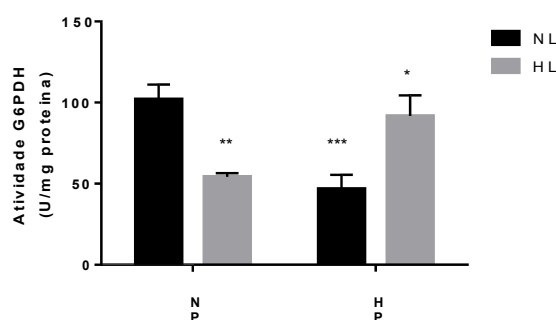


Os valores, U/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média. n=10-12 animais para cada grupo experimental.

Avaliação da atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame

Nossos resultados mostraram que houve uma redução significativa na atividade dessa enzima nos grupos NP NL vs NP HL, NP NL vs HP NL e HP NL vs HP HL em comparação aos animais alimentados com uma dieta normoprotéica ou hipoprotéica durante a gestação e lactação (Fig. 5). Como também, houve um aumento significativo entre os grupos HP HL vs HP NL (NP NL:102,055 U/mg de prot. $\pm$ 9,192; HP NP:46,823U/mg de prot. $\pm$ 8,744; NP HL:54,344U/mg de prot. $\pm$ 2,256; HP HL:91,801U/mg de prot. $\pm$ 12,589).

Figura 5 - Atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) dos grupos tratados com uma dietas hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame.

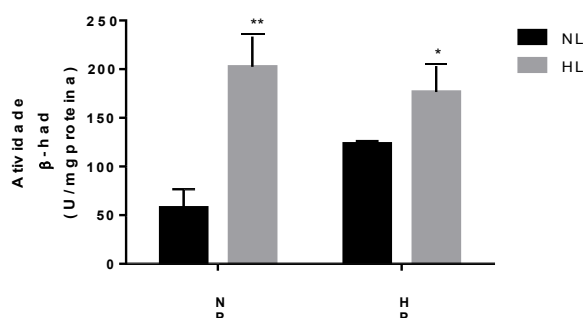


Os valores, foram expressos em U/mg de proteína e representam média $\pm$ erro padrão da média (**p=0,0101 em comparação com NP NL vs NP HL, *p=0,0096 em comparação com HP NL vs HP HL e ** p=0,0008 em comparação com NP NL vs HP NL). n=9 animais para cada grupo experimental.

Avaliação da atividade da β -hidroxyacil-CoA desidrogenase (β -HAD) em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame

Em relação a oxidação de ácidos graxos, nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo na atividade da enzima β -Had entre os grupos NP NL vs NP HL e NP NL vs HP HL em comparação aos animais tratados com uma dieta normoprotéica ou hipoprotéica durante a gestação e lactação. (NP NL: 57,667U/mg de prot. $\pm$ 19,048; HP NL:123,208U/mg de prot. $\pm$ 2,840; NP HL:202,347U/mg de prot. $\pm$ 32,636; HP HL:176,656U/mg de prot. $\pm$ 27,842) (Fig.6).

Figura 6 - Atividade da β -had em fígado de ratos adultos submetidos uma dieta hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame.

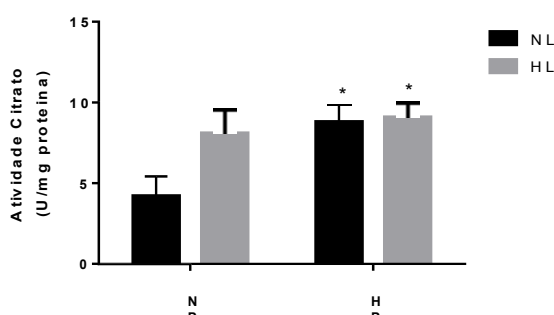


Os valores, U/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média. **p= 0,003 comparando NP NL vs NP HL. *p=0,011 comparando NP NL vs HP HL. N=6-8 animais para cada grupo experimental.

Avaliação da atividade da Citrato Sintase (CS) em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame

Em relação a atividade do ciclo de Krebs, rota central do metabolismo energético, observou-se um aumento significativo na atividade da enzima citrato sintase comparando NPNL vs HPNL e NPNL vs HPHL (NPNL:4,221U/mg de prot.±1,206; HPNL:8,811U/mg de prot.±1,159; NPHL:8,106U/mg de prot.±1,423; HPHL:9,095U/mg de prot.±0,844) (Fig.7).

Figura 7 - Atividade da Citrato sintase em fígado de ratos adultos submetidos uma dieta hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame.



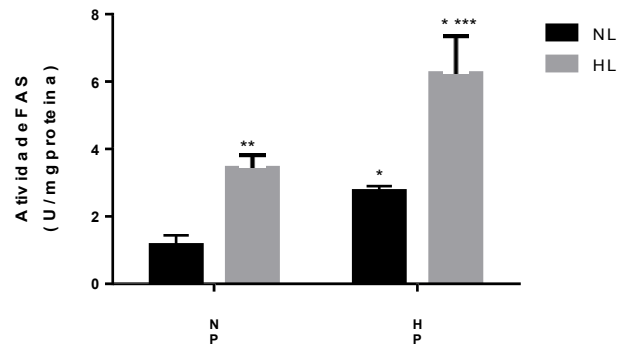
Os valores, U/mg de proteína, representam média ± erro padrão da média. *p=0,048 comparando NPNL vs HPNL; *p=0,040 em comparação com NPNL vs HPHL. N= 7-8 animais para cada grupo experimental.

Avaliação da atividade da Ácido graxo sintase (FAS) em ratos adultos submetidos às dietas hipoproteica durante gestação e lactação e dieta hiperlipídica pós-desmame

No que diz respeito a avaliação da síntese de ácidos graxos, nossos resultados mostraram que houve um aumento na atividade da enzima FAS entre os grupos NPNL vs HPHL, HPNL vs HPHL e NPHL vs HPHL em comparação aos animais tratados com uma dieta normoprotéica ou hipoprotéica durante a gestação e lactação (NPNL: 1,157U/mg de prot.±0,284; HPNL:2,754U/mg de prot.±0,151; NPHL:3,443U/mg de prot.±0,366; HPHL:6,253U/mg de prot.±1,076) (Fig. 8).

Figura 8 - Atividade da Ácido graxo Sintase (FAS) em fígado de ratos adultos

submetidos uma dieta hipoprotéica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame.



Os valores, U/mg de proteína, representam média $\pm$ erro padrão da média. **** $p=0,0001$ comparando NP NL vs HP HL. ** $p=0,0032$ em comparação com HP NL vs HP HL. * $p=0,0295$ em comparação com NP HL vs HP HL. N=6- 7 animais para cada grupo experimental.

6 DISCUSSÃO

A proposta deste trabalho foi avaliar o metabolismo hepático de ratos submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação e a uma dieta hiperlipídica do período pós-desmame a idade adulta. A literatura relata que há uma estreita relação entre o peso ao nascer e uma maior incidência de desenvolvimento de doenças metabólicas (obesidade, diabetes, hipertensão arterial, doenças cardiovasculares) na vida adulta (BARKER,1998). Nossos dados estão em concordância com a literatura, que tem demonstrado déficit nos indicadores de crescimento somático (peso corporal) em proles de ratas submetidas à dieta com baixa proteína durante período de lactação e /ou gestação (PASSOS *et al.*,2011), como também, estudos relatam que ratos provenientes de mães submetidas a restrição proteica durante a gestação costumam apresentar diminuição de peso ao nascer, além de ganho de massa corporal acelerado, que está associado a distúrbios que aumentam o risco de doenças crônicas na vida adulta (VICKERS,2011).

Em relação aos níveis séricos de albumina não observamos diferença entre os grupos analisados, diferentemente do que foi relatado na literatura, uma vez que foi observada hipoalbuminemia em ratas prenhas submetidas à restrição protéica (EL-SAYED *et al.*,2015), como também, outros autores mostram que crianças e adultos quando submetidas a uma desnutrição protéica grave podem apresentar diminuição significativa dos níveis plasmáticos de albumina (INDENBLEEK *et al.*, 1975).

Os níveis séricos de AST e ALT também não apresentaram alteração significativa entre os grupos avaliados, sugerindo que não houve indícios de lesão hepática. Outros estudos mostram que no entanto que ratos avaliados em um tempo maior de vida, verificou aumento nos níveis séricos de AST e ALT, que são indicativos de dano tecidual crônico, nos animais submetidos a uma dieta hipoproteica durante a gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame em comparação com o grupo normoproteico (ONYENEKE *et al.*,2013).

Na avaliação da atividade da enzima PFK 1 nossos resultados mostram que não ocorreu alteração na atividade de uma enzima chave na regulação da via glicolítica, o que reflete não alteração do catabolismo de carboidratos.

Diferentemente dos resultados de avaliação da atividade da enzima G6PDH, nos quais ressaltam-se a redução na atividade dessa enzima nos grupos NP NL vs NP HL, NP NL vs HP NL e HP NL vs HP HL na atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima chave da via das pentoses fosfato, podendo levar à diminuição da geração do aporte de NADPH que consequentemente pode causar alterações na biossíntese de ácidos graxos (SENA *et al.*, 1985), de compostos esteróides e déficit no combate a efeitos prejudiciais das espécies reativas de oxigênio, por alteração no estado redox celular (GOMES *et al.*, 2016). No entanto, o aumento da atividade da G6PDH no grupo HP HL em relação aos grupos que sofreram apenas um insulto nutricional pode ser entendido como uma maior resistência metabólica hepática em resposta ao primeiro insulto nutricional sofrido.

A avaliação do metabolismo lipídico foi feita através da determinação da atividade de uma enzima chave na oxidação de ácidos graxos, a β -hidroxiacil-CoA (β -Had) e de outra enzima importante na síntese de lipídios, a ácido graxo sintase (FAS). Em relação a atividade da enzima β -Had, sugere-se que a maior atividade da enzima nos grupos que sofreram os insultos nutricionais resultou num aumento do aporte de moléculas de acetil-CoA formados nas etapas da β -oxidação, que por sua vez estimularam uma maior atividade do ciclo de Krebs, podendo levar a um aumento da síntese de ATP e a uma maior utilização de ácidos graxos como substrato energético (GLISEZINSKI *et al.*, 2017). Em relação ao ciclo de Krebs, a citrato sintase é uma enzima chave no caminho metabólico gerador de energia, cujo aumento em sua atividade tem sido implicado na facilitação de rendimento de energia via metabolismo aeróbio através desse ciclo metabólico (SIU, 2016).

Em relação à atividade da FAS, estudo realizado por LIMA *et al.*, 2010 relata que dietas ricas em ácidos graxos são responsáveis pelo aumento das concentrações de componentes lipídicos, por isso o consumo está relacionado ao aumento do risco de desenvolvimento de esteatose hepática e doenças cardiometabólicas na vida adulta. Além de alterações cardiovasculares induzidas por dietas hiperlipídicas em modelos experimentais, tem sido evidenciado que elas podem induzir uma alteração no metabolismo de carboidratos e lipídios, resultando em: maior deposição de gordura; aumento nos níveis séricos de triglicerídeos, ácidos graxos e alanina aminotransferase (ALT); e acúmulo de compostos lipídicos

no fígado (LEE *et al.*, 2016). Desta forma, o aumento no anabolismo de ácidos graxos, visualizado em nosso estudo através do aumento da atividade da FAS, observado em fígado de ratos adultos submetidos uma dieta hipoproteica durante gestação e lactação e hiperlipídica pós-desmame pode acarretar não apenas em esteatose hepática, como também uma maior predisposição a doenças crônicas metabólicas ao longo da vida (SIMÕES-ALVES, 2019).

7 CONCLUSÃO

Ratos submetidos à restrição proteica durante gestação e lactação seguida de uma dieta hiperlipídica pós-desmame apresentam modulações distintas no metabolismo hepático de carboidratos e lipídios na vida adulta. De fato, a restrição proteica materna é capaz de induzir uma redução significativa do peso corporal dos grupos NPNL vs HPNL, porém não acarreta alterações significativas nos níveis séricos de albumina, o que não compromete o transporte de íons e ácidos graxos, e nem nos níveis séricos das aminotransferases, indicando que não houve dano tecidual hepático aos 90 dias de vida desses animais. Em relação à atividade metabólica, a redução da atividade da G6PDH pode levar a uma diminuição de NADPH e consequentemente interferir na biossíntese de outros compostos, além de prejudicar também o balanço redox hepático. Nossos resultados sugerem também uma mudança de oxidação de substrato energético em resposta as variações nutricionais sofridas no início da vida desses animais, levando a uma maior utilização de ácidos graxos resultando numa maior oferta de Acetil-CoA tanto para o ciclo de Krebs quanto para síntese de ácidos graxos. A maior atividade do ciclo de Krebs pode ser entendida como uma forma de readaptação metabólica aos insultos sofridos, no entanto, a maior atividade da FAS indicando aumento na síntese de ácidos graxos, que pode levar a um acúmulo de gordura a longo prazo nesses animais predispondo-os a um maior risco de doenças crônico-metabólicas.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, M. F. *et al.* Can physical exercise during gestation attenuate the effects of a maternal perinatal low-protein diet on oxygen consumption in rats? **Exp Physiol**, Londres, v. 94, n. 8, p. 906-13, Aug 2009.
- BALLEN, M. L. *et al.* [Protein restriction in pregnancy: effects related to dam metabolism]. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 87-94, Feb 2009.
- BARKER, D. J. The fetal and infant origins of adult disease. **BMJ**, Londres, v. 301, n. 6761, p. 1111, Nov 17 1990.
- _____. The intrauterine origins of cardiovascular disease. **Acta Paediatr Suppl**, Estolcomo, v. 82 Suppl 391, p. 93-9; discussion 100, Sep 1993.
- _____. Maternal nutrition, fetal nutrition, and disease in later life. **Nutrition**, Amsterdã, v. 13, n. 9, p. 807-13, Sep 1997.
- _____. In utero programming of chronic disease. **Clin Sci (Lond)**, Londres, v. 95, n. 2, p. 115-28, Aug 1998.
- _____. Fetal origins of cardiovascular disease. **Ann Med**, Londres, v. 31 Suppl 1, p. 3-6, Apr 1999.
- _____. In utero programming of cardiovascular disease. **Theriogenology**, Milão, v. 53, n. 2, p. 555-74, Jan 15 2000.
- _____. The origins of the developmental origins theory. **J Intern Med**, Londres, v. 261, n. 5, p. 412-7, May 2007.
- BATISTA FILHO M, C. N., VARELA RM, SOUZA MARTINS MH, SALZANO AC, BAZANTE MO. Inquérito nutricional em área urbana da Zona da Mata Sul do Nordeste Brasileiro – Água Preta – PE. **O Hospital**, California, v. 79, p. 139-155, 1971.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, p. S181-S191, 2003.
- BERGMEYER, H. U.; MOELLERING, H. [Acyolphosphate: D-glucose-6-phosphotransferase]. **Biochem Z**, Berlim, v. 343, n. 1, p. 97-102, Nov 05 1965.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, Nova York, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.
- Biosca, M., Rodríguez, G., Ventura, P., Samper, M. P., Labayen, I., Collado, M. P., *et al.* Central adiposity in children born small and large for gestational age. **Nutr. Hosp**, Madrid, v. 26, 971–976, 2011.

CARVALHO, M. F. *et al.* Experimental diet based on the foods listed in the Family Budget Survey is more detrimental to growth than to the reflex development of rats. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 26, p. 177-196, 2013.

DANIEL, S. Pratt; MARSHALL, M. Kaplan. Evaluation of Liver Function. In: KASPER, DL *et al.* (ed.) **Harrison's Principles of Internal Medicine**. 16. Nova York: McGraw-Hill, 2005. Cap. 283, p. 1813-17.

ARRUDA, T. L. **Efeitos do treinamento físico moderado na bioenergética mitocondrial e atividade de enzimas metabólicas de fígado de ratos juvenis submetidos a restrição proteica perinatal**. 2017. f 102 .Dissertação (Nutrição) - Departamento de Neuropsiquiatria e ciências do comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

ALVES, J. L. de B. **Restrição proteica materna induz hiperatividade simpático-respiratória e altera a expressão de genes metabólicos na prole de ratos: estudo dos mecanismos fisiológicos e moleculares**. 2016. f 168. Tese (Educação física) - Departamento de Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

ALVES, J. L. 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. **Br J Nutr**, Newcastle, v. 111, p. 606-615, 2014.

SOUSA, E. Transição nutricional no Brasil: análise dos principais fatores. **Cadernos UniFOA**, Rio de Janeiro, n. 13, ago. 2010.

DI PIETRO, G. *et al.* Profile development of noncommunicable chronic diseases in a Brazilian rural town. **J Am Coll Nutr**, Londres, v. 34, n. 3, p. 191-8, 2015.

EL-SAYED, Hala M.; REZK, M. M.; EL-MAGHRABY R. M. Study of Plasma Albumin, Transferrin, and Fibronectin in Children with Mild to Moderate Protein-energy Malnutrition. **Journal of Tropical Pediatrics**, Moçambique, v. 44, p. 362-365, 1998.

ERHUMA, A. *et al.* Prenatal exposure to a low-protein diet programs disordered regulation of lipid metabolism in the aging rat. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Michigan, v. 292, n. 6, p. E1702-14, Jun. 2007.

FALCÃO-TEBAS, Filipe *et al.* Effects of physical training during pregnancy on body weight gain, Blood glucose and cholesterol in adult rats submitted To perinatal undernutrition. **Rev Bras Med Esporte**, São Paulo, v. 18, n. 1, P.58-62, jan./fev. 2012.

FERRO CAVALCANTE, T. C. *et al.* Effects of a westernized diet on the reflexes and physical maturation of male rat offspring during the perinatal period. **Lipids**, Londres, v. 48, n. 11, p. 1157-68, Nov. 2013.

FIDALGO, M. *et al.* Programmed changes in the adult rat offspring caused by maternal protein restriction during gestation and lactation are attenuated by maternal

moderate-low physical training. **Br J Nutr.**, Newcasthe - Reino Unido, v. 109, n. 3, p. 449-456, 2013.

GLUCKMAN, P. D.; HANSON, M. A. Developmental plasticity and human disease: research directions. **J Intern Med**, Suécia, v. 261, n. 5, p. 461-71, May 2007.

GOODRIDGE, A. G. Regulation of fatty acid synthesis in isolated hepatocytes. Evidence for a physiological role for long chain fatty acyl coenzyme A and citrate. **J Biol Chem**, Berlim, v. 248, n. 12, p. 4318-26, Jun 25 1973.

GÓMEZ-MANZO, S. *et al.* Glicose-6-fosfato desidrogenase: atualização e análise de novas mutações em todo o mundo. **Int J Mol. Sci.**, Basileia - Suíça, v. 17, n. 12, p. 2069, 2016.

HARRIS, J. E.; BAER, L. A.; STANFORD, K. I. Maternal Exercise Improves the Metabolic Health of Adult Offspring. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, New York, v. 29, n. 3, p. 164-177, mar. 2018.

HASAN, M. T. *et al.* Long-term changes in childhood malnutrition are associated with long-term changes in maternal BMI: evidence from Bangladesh, 1996-2011. **Am J Clin Nutr**, Boston, Aug 31 2016.

HENRIKSEN, E. J. *et al.* The high-fat-fed lean Zucker rat: a spontaneous isocaloric model of fat-induced insulin resistance associated with muscle GSK-3 overactivity. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Missouri, v. 294, n. 6, p. R1813-21, Jun. 2008.

HENRY, J. Blinder and Adrian Reuben. Nutrient Digestion and Absorption. *In*: BORON, Walter F.; BOULPAEP, Emile L. (eds.). **Medical physiology**. Porto: Saunders, 2003. Cha. 44, p. 947-974.

HERRAN, O. F.; PATINO, G. A.; DEL CASTILLO, S. E. Dietary transition and excess weight in adults according to the Encuesta de la Situacion Nutricional en Colombia, 2010. **Biomedica**, Bogotá, v. 36, n. 1, p. 109-20, 2016.

HOU, C. *et al.* Coral calcium hydride prevents hepatic steatosis in high fat diet-induced obese rats: A potent mitochondrial nutrient and phase II enzyme inducer. **Biochem Pharmacol**, Kansas, v. 103, p. 85-97, Mar 1 2016.

ITO, M. *et al.* High levels of fatty acids increase contractile function of neonatal rabbit hearts during reperfusion following ischemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, Michigan, v. 298, n. 5, p. H1426-37, May 2010.

INGENBLEEK, Y.; VAN DEN SCHENCK, H. G.; NAYER, P. Albumin, transferrin and the thyroxin binding prealbumin/retinol binding protein complex in assessment of malnutrition. **ClinChemActa**, Bélgica, v. 3, p. 61, 1975.

JAHAN-MIHAN, A. *et al.* The Role of Maternal Dietary Proteins in Development of Metabolic Syndrome in Offspring. **Nutrients**, Grã Camária, v. 7, n. 11, p. 9185-217, Nov 2015.

KAHLE, M. *et al.* High fat diet-induced modifications in membrane lipid and mitochondrial-membrane protein signatures precede the development of hepatic insulin resistance in mice. **Mol Metab**, Neuherberg, v. 4, n. 1, p. 39-50, Jan 2015.

LEE, S. B. *et al.* Wild ginseng cambial meristematic cells ameliorate hepatic steatosis and mitochondrial dysfunction in high-fat diet-fed mice. **J Pharm Pharmacol**, Belfast, v. 68, n. 1, p. 119-27, Jan 2016.

LIMA, F.E *et al.* Fatty Acids and cardiovascular diseases: a review. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 13, n. 2, p.73-80, May/Aug 2010.

LU, K. L. *et al.* Hepatic beta-oxidation and regulation of carnitine palmitoyltransferase (CPT) I in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala* fed a high fat diet. **PLoS One**, Furth, v. 9, n. 3, p. e93135, 2014.

MARTIN-GRONERT, M. S.; OZANNE, S. E. Mechanisms underlying the developmental origins of disease. **Rev Endocr Metab Disord**, Heidelberg - Alemanha, v. 13, n. 2, p. 85-92, Jun. 2012.

MONDINI, L. *et al.*, Mudanças no padrão de alimentação da população urbana brasileira. **Rev.Saúde Pública**, São Paulo, v. 26, n. 6, p. 433-9, 2015.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

OPIE, L. H.; NEWSHOLME, E. A. The activities of fructose 1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. **Biochem J**, Londres, v. 103, n. 2, p. 391-9, May 1967.

ONYENEKE, E. C. *et al.* Liver function status in some nigerian children with protein energy malnutrition. **Orient Journal of Medicine**, v. 15, p. 58-63, 2013.

PARK, K. S. *et al.* Fetal and early postnatal protein malnutrition cause long-term changes in rat liver and muscle mitochondria. **J Nutr**, Texas, v. 133, n. 10, p. 3085-90, Oct 2003.

PASSOS, M. C. F, RAMOS, C. F. Comportamento alimentar de ratos adultos submetidos à restrição protéica cujas mães sofreram desnutrição durante a lactação. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 14, supl. 1, p. 7-11, 2011.

QASEM, R. J. *et al.* Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. **Physiol Behav**, Zurique, v. 105, n. 5, p. 1182-93, 2012.

RAMADAN, W. S.; ALSHIRAIHI, I.; AL-KARIM, S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. **Ann Anat**, Erlangem, v. 195, n. 1, p. 68-76, Jan 2013.

REEVES, P. G.; NIELSEN, F. H.; FAHEY JR, G. C. 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**, Texas, v. 123, n. 11, p. 1939-51, Nov 1993.

RIBEIRO, A. M. *et al.* [Low birth weight and obesity: causal or casual association?]. **Rev Paul Pediatr**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 341-9, Jul-Sep 2015.

RINALDI, A. E. *et al.* Dietary factors associated with metabolic syndrome and its components in overweight and obese Brazilian schoolchildren: a cross-sectional study. **Diabetol Metab Syndr**, São Paulo, v. 8, n. 1, p. 58, 2016.

RUI, L. Energy metabolism in the liver. **Compr Physiol**, Rockville, v. 4, n. 1, p. 177-97, Jan 2014.

SANTOS, P.E.B. *et al.* Efeitos cardiovasculares agudos da exposição ao ambiente macrogravitacional. **Arq.Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 80, n. 1, p.1-11, Jan. 2008

SAWAYA, A. L. *et al.* Obesity and malnutrition in a Shantytown population in the city of Sao Paulo, Brazil. **Obes Res**, Adelaide, v. 3 Suppl 2, p. 107s-115s, Sep 1995.

SAWAYA, A. L. *et al.* The link between childhood undernutrition and risk of chronic diseases in adulthood: a case study of Brazil. **Nutr Rev**, Campinas, v. 61, n. 5 Pt 1, p. 168-75, May 2003.

SCHULER, S. L. *et al.* Hepatic and thymic alterations in newborn offspring of malnourished rat. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, Chicago, v. 32, p. 184-9, 2008.

SENA, L. L. A.; RAMALHO, A. S. Clinical evolution of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in a Brazilian population. **Braz J Genet**, Ribeirão Preto, v. 8, p.9-96, 1985.

TEODOSIO, N. R. *et al.* A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch Latinoam Nutr**, Caracas, v. 40, n. 4, p. 533-47, Dec 1990.

SIMÕES-ALVES, A. C. *et al.* Bioenergética mitocondrial prejudicada pela dieta e rica em ácidos graxos saturados no fígado de ratos desnutridos durante períodos críticos de desenvolvimento. **Células**, v. 8, n. 4, p. 335, 2019.

TREFTS, E.; GANNON, M.; WASSERMAN, D. H. The liver. **Current Biology**, London, v. 27, n. 21, p. 1147–1151, nov. 2017.

VOET, Donald; VOET, Judith; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

WEST-EBERHARD, M. J. Developmental plasticity and the origin of species differences. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Whashington, v. 102, Supl. 1, p. 6543-9, May 3 2005.

**ANEXO A - ARTIGO A SER SUBMETIDO AO BRAZILIAN JOURNAL OF
NUTRITION**

Fator de impacto: 0.333

Qualis: B1 (Enfermagem)

**EFEITOS DE UMA DIETA HIPERLÍPIDICA PÓS-DESMAME SOBRE ENZIMAS
METABÓLICAS HEPÁTICAS DE RATOS SUBMETIDOS À RESTRIÇÃO PROTEICA
DURANTE A GESTAÇÃO E LACTAÇÃO¹**

Ezequiel Moura dos Santos², Aiany Cibelle Simões Alves³, Mariana Pinheiro
Fernandes⁴

¹ O Artigo foi elaborado a partir da Tese de ALVES, A. C. S., intitulada “Avaliação dos efeitos de dieta hiperlipídica pós-desmame sobre parâmetros cardiometabólicos de ratos submetidos à dieta hipoproteica perinatal”. Universidade Federal de Pernambuco; a qual será apresentada no ano de 2021.

² Núcleo de Enfermagem, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão- Pernambuco, 55608-680, Brasil.

³ Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão- Pernambuco, 55608-680, Brasil.

⁴ Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão- Pernambuco, 55608-680, Brasil.

Correspondência para Fernandes, M. P. Rua Alto do Reservatório, S/N, Bela Vista, Vitória de Santo Antão, PE. CEP:55608-680 Fone/Fax: 558135233351. E-mail: marianapfernades@yahoo.com.br

APÊNDICE A



**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biotecnologias**

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 01 de setembro de 2017.

Ofício nº 87/17

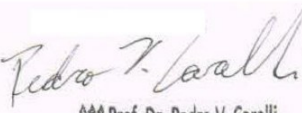
Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Mariana Pinheiro Fernandes**
Núcleo de Educação Física e Ciências do Esporte
Centro Acadêmico de Vitória
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº **23076.016634/2017-52**

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação dos efeitos de dieta hiperlipídica pós-desmame sobre parâmetros cardiometabólicos de ratos submetidos à dieta hipoproteica perinatal**”, registrada com o nº **23076.016634/2017-52**, sob a responsabilidade de Prof.ª **Mariana Pinheiro Fernandes** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/09/2017 a 01/03/2021
Espécie/linhagem/raça	Ratos heterogênicos Wistar
Nº de animais	84
Peso/Idade	220-260g / 80-90 dias
Sexo	Machos (68) e fêmeas (16)
Origem	Biotério do CAV-UFPE

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
SIAPE 1801584